

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
(NEUROSCIENCES)

PAR
MARIE-EVE LARAMÉE

FACTEURS DÉTERMINANT LA STRUCTURE DES AFFÉRENCES ET
EFFÉRENCES DU CORTEX VISUEL PRIMAIRE CHEZ LA SOURIS

OCTOBRE 2012

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH.D.)
(NEUROSCIENCES)

Programme offert par l'Université du Québec à Trois-Rivières

FACTEURS DÉTERMINANT LA STRUCTURE DES AFFÉRENCES ET EFFÉRENCES
DU CORTEX VISUEL PRIMAIRE CHEZ LA SOURIS

PAR

MARIE-EVE LARAMÉE

Denis Boire, directeur de recherche

Université du Québec à Trois-Rivières

Maria-Grazia Martinoli, présidente du jury

Université du Québec à Trois-Rivières

Gilles Bronchti, codirecteur de recherche

Université du Québec à Trois-Rivières

Stéphane Molotchnikoff, évaluateur externe

Université de Montréal

Martin Paré, évaluateur externe

Queen's University, Ontario

Thèse soutenue le 24 octobre 2012

*“Life can only be understood backwards;
but it must be lived forwards.”*

Søren Kierkegaard

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche principal, le professeur Denis Boire, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire alors que je finissais ma deuxième année d'études au baccalauréat et que j'hésitais à me lancer dans ce monde mystérieux qu'est la recherche. J'ai découvert un univers fascinant où la persévérance est de mise, mais où les efforts sont toujours récompensés. Merci Denis pour les longues discussions, vos critiques constructives, votre disponibilité, votre patience, votre intégrité et votre dévouement. Merci d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir transmis votre passion pour la recherche et l'enseignement. Merci finalement pour m'avoir donné la chance d'enseigner et l'opportunité d'effectuer des stages à l'étranger. Grâce à vous, mon passage au laboratoire aura été très enrichissant, tant sur le plan scientifique que personnel.

J'aimerais aussi remercier mon codirecteur de recherche, le professeur Gilles Bronchti, pour ses commentaires constructifs et ses conseils. Je voudrais aussi le remercier pour m'avoir donné l'opportunité de participer à des formations complémentaires qui m'ont permis de rencontrer de grands chercheurs, d'élargir mes connaissances et d'aviver ma passion pour la neuroscience. Merci aussi de m'avoir appris, dès les premières semaines, que la recherche, c'est beaucoup plus que de simples heures passées au laboratoire, mais bien l'expérience d'une vie où chaque opportunité doit être saisie.

Merci aux nombreux collègues que j'ai eu la chance de côtoyer au fil des ans. Ils ont été une deuxième famille et ils ont su rendre agréables les longues journées passées au laboratoire. Merci à Stéphanie Prince, pour sa patience et sa bonne humeur, malgré les heures passées au microscope. Merci à Nicole Chabot, la « maman du laboratoire », de toujours avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions. Merci à Robin Tremblay, pour nos discussions scientifiques et pour son humour particulier. Merci aussi à Sonia Guillemette de m'avoir aidée à passer au travers diverses épreuves. Nos multiples marches jusqu'à la Chasse Galerie et nos discussions autour d'un bon café

m'ont encouragée à persévérer. Merci à Ian Massé pour son humour et pour avoir accepté de visiter mon appartement pendant mon stage en Belgique. Grâce à lui, j'ai pu quitter le pays avec l'esprit tranquille. Merci finalement à Joshua Cloutier-Beaupré et Jonathan Pommainville d'avoir su faire du laboratoire un endroit dynamique et convivial.

J'aimerais par la suite remercier Dr Kathleen Rockland et Dr Lutgarde Arckens pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires, respectivement situés au RIKEN, au Japon, et à l'Université Catholique de Louvain, en Belgique. Merci à vous deux de m'avoir donné l'opportunité d'utiliser vos installations et de m'avoir intégrée à vos équipes. Ces stages m'ont fait découvrir des gens dynamiques et passionnés par leurs recherches, et une culture de recherche différente et stimulante.

Du laboratoire de Kathleen Rockland, j'aimerais remercier le Dr Tohru Kurotani, qui a préparé mes souris avant mon arrivée. Merci à Marie Windsor et James Hayden, pour m'avoir appris à utiliser l'appareillage et pour avoir su faciliter mon intégration dans ce milieu culturel étonnant. Merci finalement à Kazumi Ohta pour sa disponibilité, sa patience et son aide technique.

Du laboratoire de Lutgarde Arckens, j'aimerais remercier Tjing-Tjing Hu, pour son aide technique et pour avoir traduit les nombreux protocoles du flamand à l'anglais. Merci à Lieve Geenen, pour ses explications, sa disponibilité et pour m'avoir montré la marche à suivre pour la réalisation des expériences. Merci aussi à Ria Vanlaer, Julie Nys, Jeroen Aerts, Samme Vreysen, Katrien Smolders, Ellen Ytebrouck, Laurens Minerva et Annelies Laeremans pour m'avoir accueillie si chaleureusement.

Je voudrais aussi remercier le Réseau de Recherche en Science de la Vision pour la bourse de recrutement que j'ai reçue au début de mes études aux cycles supérieurs et la bourse pour le stage au Japon. Merci aussi au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en génie du Canada de m'avoir octroyé une bourse de doctorat Alexander-Graham Bell, ainsi que le supplément Michael-Smith pour le stage en Belgique. Ces

bourses ont été beaucoup plus qu'un simple support financier; elles ont été un tremplin pour ma carrière scientifique.

Je remercie finalement ma famille et mes amis, qui n'ont pas toujours compris, mais qui m'ont toujours encouragée. Merci d'avoir accepté que le travail à accomplir limitait parfois le temps passé avec vous. Sachez par contre que chaque instant en votre compagnie a d'autant plus compté. Merci finalement pour les petites tapes dans le dos et les soirées quelques fois arrosées. Ce sont ces gestes qui m'ont donné la force de continuer.

AVANT-PROPOS

Les travaux effectués au cours de cette thèse seront présentés sous forme de manuscrit et d'article scientifique.

Le premier article de cette thèse est présenté sous forme de manuscrit. L'effet de l'expérience sur la mise en place des connexions entre l'aire visuelle primaire et les aires extrastriées a été étudié en rapport aux patrons de connexions calleuses chez la souris voyante, énucléée et anophtalme. Cette étude démontre la présence d'une topographie anormale des projections striées-extrastriées chez les deux groupes de souris aveugles. Cet effet est plus important chez les souris anophtalmes. J'ai réalisé l'ensemble des expérimentations et des analyses. L'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit ont été effectuées en collaboration avec Denis Boire. Gilles Bronchti a contribué par son rôle de codirecteur. Nous prévoyons soumettre ce manuscrit avant la fin de l'été 2012.

Le deuxième article de cette thèse démontre l'existence d'une connexion cortico-corticale indirecte entre les cortex auditif et visuel primaire, qui passe par les aires visuelles extrastriées latérales. L'effet de l'énucléation bilatérale chez la souris a aussi été étudié. Pour cette étude, j'ai réalisé plus de 90 % des manipulations et des analyses. Tohru Kurotani, 2^e auteur, a réalisé les énucléations et entretenu la colonie de souris avant mon arrivée dans le laboratoire du Dr Rockland au Japon. L'écriture de l'article s'est faite en collaboration avec Denis Boire, Kathleen Rockland et Gilles Bronchti, qui sont tous coauteurs. Cet article a été publié dans la revue *European Journal of Neuroscience* en juillet 2011 (Laramée *et al.* 2011. "Indirect pathway between the primary auditory and visual cortices through layer V pyramidal neurons in V2L in mouse and the effects of bilateral enucleation", *Eur. J. Neurosci.* 34(1). 65-78)

Le troisième article présenté dans cette thèse concerne l'organisation des connexions *feedback* vers le cortex visuel primaire, à partir des aires auditives et

somesthésiques primaires et des aires visuelles secondaires latérales et médiales des cortex ipsilatéral et controlatéral. Dans cette étude, j'ai réalisé plus de 80 % des manipulations et analyses. Stéphanie Prince, 2^e auteure, a participé à la reconstruction tridimensionnelle de neurones pyramidaux. L'écriture de l'article s'est fait en collaboration avec Denis Boire, Kathleen Rockland et Gilles Bronchti, tous coauteurs de cet article publié dans la revue *Cerebral Cortex*. Cet article est disponible en ligne depuis mars 2012 (Laramée *et al.* 2012. "Principal component and cluster analysis of layer V pyramidal cells in visual and non-visual cortical areas projecting to the primary visual cortex of the mouse", *Cereb. Cortex*. 2012. Epub Ahead of Print.)

RÉSUMÉ

Le cortex cérébral est un ensemble d'aires corticales interreliées par différents réseaux de fibres. La microstructure de ces réseaux corticaux n'est pas bien comprise. Différents facteurs semblent influencer leur structure. La morphologie des neurones de projection pourrait dépendre de l'expérience sensorielle, de la modalité sensorielle, de leur situation dans la hiérarchie corticale et de la latéralité des connexions. Les études qui ont déterminé ces facteurs ne se sont cependant pas intéressées à la morphologie de neurones impliqués dans des connexions connues. Les travaux effectués dans cette thèse avaient donc pour but de caractériser la microstructure des circuits corticaux multimodaux et de déterminer les facteurs qui façonnent la morphologie des neurones impliqués dans ce type de connexions. Nous avons étudié les connexions cortico-corticales efférentes, afférentes directes et afférentes indirectes du cortex visuel primaire. Nous avons découvert que l'expérience sensorielle assure la mise en place des circuits corticaux et leur développement normal. En absence d'afférence visuelle, ces circuits se développent, mais leur microstructure est altérée. Nous avons aussi découvert l'existence de connexions multimodales indirectes et qu'une seule connexion descendante peut être constituée de neurones pyramidaux aux morphologies hétérogènes. Nos résultats suggèrent aussi que la modalité sensorielle, la hiérarchie corticale et la latéralité ne semblent pas être des facteurs déterminants pour l'organisation de ces circuits corticaux.

Ces travaux permettront de mieux comprendre l'algorithme d'analyse utilisé par le cortex cérébral pour créer un percept (multi)sensoriel. Les résultats obtenus dans cette thèse permettront aussi de mettre au point des modèles théoriques de l'organisation corticale qui tiennent compte des différentes voies corticales impliquées. Nous avons démontré que ces voies peuvent être directes, indirectes, homomodales et hétéromodales. Nous avons aussi démontré l'influence de l'expérience sensorielle dans le développement des circuits ascendants et descendants. Ceci permettra de comprendre comment ils s'organisent pendant le développement et comment la perte d'un sens peut altérer la transmission et le traitement de l'information sensorielle.

Mots-clés : cortex visuel primaire, aires visuelles extrastriées, connexions calleuses, microcircuits corticaux, arborisation dendritique, morphologie, intégration multisensorielle.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
AVANT-PROPOS.....	vii
RÉSUMÉ.....	ix
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les voies ascendantes sensorielles	1
1.1.1 Le système visuel.....	2
1.1.2 Les voies somesthésiques	5
1.1.3 Les voies auditives.....	6
1.2 Le cortex cérébral	6
1.2.1 Les aires visuelles corticales.....	7
1.2.1.1 Les aires visuelles corticales chez la souris.....	9
1.2.2 Les aires extrastriées et les connexions calleuses.....	13
1.2.3 Représentation visuotopique dans les aires extrastriées	14
1.3 Hiérarchie corticale.....	17
1.3.1 Traitement hiérarchique de l'information sensorielle.....	17
1.3.2 Intégration multisensorielle	18
1.3.2.1 Intégration multisensorielle sous-corticale.....	22
1.4 Connexions cortico-corticales	24
1.5 Facteurs qui influencent le développement des circuits corticaux	25
1.5.1 Facteurs intrinsèques.....	25
1.5.1.1 Le développement de la carte corticale	25
1.5.1.2 Le développement de la structure axonale.....	28
1.5.2 Facteurs extrinsèques	28
1.5.2.1 La cécité et les connexions cortico-corticales	29
1.5.2.2 Effet d'une déprivation visuelle sur les connexions striées-extrastriées et les projections calleuses.....	31
1.5.3 Des facteurs qui influencent la morphologie neuronale	33
1.6 Objectifs et hypothèses de recherche.....	33

1.6.1	Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux	33
1.6.2	Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels.....	34
1.6.3	Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticale descendante.....	35
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES		37
2.1	Modèles animaux.....	37
2.1.1	Souris C57BL/6	37
2.1.2	Souris C57BL/6 énucléée à la naissance	38
2.1.3	Souris ZRDCT/An	39
2.2	Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux.....	41
2.2.1	Injection de traceurs antérogrades	42
2.2.2	Injection de traceurs rétrogrades	42
2.3	Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels	43
2.3.1	L'adénovirus, un marqueur rétrograde	43
2.3.2	Microscopie confocale.....	44
2.4	Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticales descendantes.....	45
2.4.1	Analyse des composantes principales.....	45
2.4.2	Analyse de groupement	49
CHAPITRE III		
PRIMARY VISUAL CORTEX PROJECTIONS TO EXTRASTRIATE CORTICES IN ENUCLEATED AND ANOPHTHALMIC MICE		51
Résumé.....		52
Abstract		54
Introduction		55
Methods.....		57
Mice		57
Neonatal enucleations.....		57
Injections and tissue processing.....		57
V1-extrastriate projections.....		57

V1-extrastriate projections with respect to callosal projection zones: ...	58
Perfusion and tissue processing	58
Analysis	59
Quantitative analysis.....	61
Results	61
V1-extrastriate projections.....	61
Anterograde BDA and PHAL labeling.....	62
Callosal projections	62
V1-extrastriate projections.....	64
Topographic representation of V1-extrastriate projections	66
V1-extrastriate and callosal projections overlap.....	72
Discussion	73
Technical issues	73
Callosal projections.....	73
Labeling of V1-extrastriate projections and cortical reconstructions	74
Effect of visual deprivation on the tangential and radial distribution of striate-extrastriate projections.....	75
Striate extrastriate projections and callosal connections	76
Topography of striate-extrastriate projections	77
Link between callosal and striate-extrastriate projections.....	78
Acknowledgements	79
References	80
Table legends	86
Figure legends	87

CHAPITRE IV

INDIRECT PATHWAY BETWEEN THE PRIMARY AUDITORY AND VISUAL CORTICES THROUGH LAYER V PYRAMIDAL NEURONS IN V2L IN MOUSE AND THE EFFECTS OF BILATERAL ENUCLEATION	97
Résumé.....	98
Abstract	100
Introduction	101
Methods.....	102
Mice	103
Neonatal enucleation	103

Injections and tissue processing.....	103
Immunoperoxidase staining.....	104
Immunofluorescence staining.....	105
Data analysis.....	105
Immunoperoxidase staining.....	105
Immunofluorescence staining.....	106
Statistical analysis.....	108
Results.....	109
Validation of the immunofluorescence staining.....	109
Injection sites.....	109
V2L neuron morphology.....	109
Morphology of V2L neurons receiving auditory inputs.....	111
A1-V2L-V1 pathway.....	112
Discussion.....	114
V2L neuron morphology.....	114
A1-V2L-V1 pathway.....	115
Morphology of the A1-V2L-V1 neurons.....	116
Reorganization of the A1-V2L-V1 pathway in blind mice.....	116
Direct cortico-cortical connections.....	117
Technical considerations.....	118
Conclusion.....	119
Acknowledgements.....	119
Abbreviations.....	120
References.....	121
Table legends.....	130
Figure legends.....	131

CHAPITRE V

PRINCIPAL COMPONENT AND CLUSTER ANALYSIS OF LAYER V PYRAMIDAL CELLS IN VISUAL AND NON-VISUAL CORTICAL AREAS PROJECTING TO THE PRIMARY VISUAL CORTEX OF THE MOUSE.....

Résumé.....	144
Abstract.....	146
Introduction.....	147

Methods.....	149
Injections and tissue processing.....	149
Validation of injection sites	150
Selection of neurons	151
3D reconstruction.....	151
Computer-assisted analysis.....	151
Principal component analysis (PCA).....	152
Cluster analysis.....	153
Sholl analysis.....	153
Statistical analysis.....	153
Results.....	154
Injection site and retrograde labeling	154
Morphological types	155
Principal component analysis (PCA).....	155
Cluster analysis.....	156
Sholl analysis.....	158
Spine distribution.....	159
Discussion	159
Layer V pyramidal cell subtypes	160
Principal component analysis (PCA).....	161
Cluster analysis.....	162
Spine distribution.....	165
Conclusion	165
Acknowledgements.....	166
References.....	167
Table legends	173
Figure Legends.....	174
Supplementary Figures legend.....	176
CHAPITRE VI	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	190
6.1 Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux.....	190
6.1.1 Les facteurs intrinsèques et les aires extrastriées.....	192

6.1.2	L'activité spontanée de la rétine	193
6.2	Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels	194
6.2.1	Importance de la connexion indirecte	195
6.2.2	Effet de l'expérience visuelle sur la connexion indirecte	197
6.3	Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticale descendante	199
6.3.1	Hétérogénéité des connexions descendantes vers le cortex visuel primaire	200
6.3.1.1	Un continuum de morphologies.....	204
6.4	Les circuits corticaux	204
6.4.1	Un modèle théorique de l'architecture corticale	205
6.4.2	Les particularités de la souris.....	208
6.4.3	Les circuits corticaux et la perception sensorielle	208
6.4.3.1	Les modèles de perception sensorielle consciente.....	211
6.4.3.2	La souris comme modèle de perception sensorielle consciente	217
CHAPITRE VII		
CONCLUSION.....		219
RÉFÉRENCES.....		221

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Le cortex cérébral	1
1.2 Les voies visuelles	4
1.3 Niveaux hiérarchiques et convergence	8
1.4 Les voies ventrale et dorsale	9
1.5 Les aires extrastriées de la souris.....	11
1.6 Les voies ventrale et dorsale chez la souris	12
1.7 Connexions calleuses chez la souris	14
1.8 Représentation visuotopique du cortex visuel primaire et des aires extrastriées	16
1.9 Traitement de l'information sensorielle et hiérarchie corticale	18
1.10 Convergence des informations sensorielles vers les aires associatives multimodales.....	19
1.11 Modèle de continuum de réponses multimodales.....	21
1.12 L'influence d'un contact synaptique sur un neurone dépend de sa localisation sur l'arborisation dendritique	22
1.13 Les centres organisateurs du prosencéphale	26
1.14 Le rôle des homéogènes Emx2 et Pax6	27

2.1	Absence de nerf optique, chiasma optique et tractus optique chez la souris ZRDCT/AN	39
2.2	Le gène à homéobox Rx/rax et sa mutation chez la souris ZRDCT/AN.....	41
2.3	Analyse des composantes principales.....	47
2.4	Lien entre <i>eigenvector</i> , <i>eigenvalue</i> et matrice de corrélation des variables	48
6.1	Interaction entre facteurs intrinsèques et extrinsèques	193
6.2	Interactions audio-visuelles dans l'aire visuelle secondaire latérale	196
6.3	Les trois types de neurones pyramidaux de la couche 5.....	202
6.4	Le cortex cérébral, un réseau d'aires corticales.....	206
6.5	Les champs récepteurs et les connexions corticales.....	209
6.6	Les connexions corticales et le lobe frontal.....	212
6.7	La discrimination « <i>figure-ground</i> ».....	214
6.8	Les voies descendantes et la perception	215
6.9	Les voies descendantes et la perception (partie 2).....	216

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

A	Aire extrastriée antérieure
A1	Cortex auditif primaire
AdSynEGFP	Adénovirus de type 5 qui exprime la protéine fluorescente verte amplifiée sous le promoteur de la synapsine
AL	Aire extrastriée antéro-latérale
AM	Aire extrastriée antéro-médiale
ARN	Acide ribonucléique
E	Jour embryonnaire
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
LGN	Noyau géniculé latérodorsal du thalamus
LI	Aire extrastriée latéro-intermédiaire
LM	Aire extrastriée latéro-médiale
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
P	Aire extrastriée postérieure
PM	Aire extrastriée postéro-médiale
POR	Aire extrastriée post-rhinale
RL	Aire extrastriée rostro-latérale
V1	Cortex visuel primaire
V2L	Cortex visuel secondaire latéral

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les voies ascendantes sensorielles

L'information sensorielle est acheminée, depuis les organes des sens jusqu'au cortex cérébral par des voies parallèles et indépendantes. Une exception à cette règle a été démontrée chez le cochon d'inde. Chez cet animal, les noyaux cochléaires et les collicules inférieurs, des structures auditives sous-corticales, reçoivent des informations sensibles de la face par la voie trigéminal (Shore et al. 2000; Zhou & Shore 2004; Zhou & Shore 2006).

Chez les mammifères, les aires sensorielles primaires du cortex cérébral sont localisées des endroits comparables (Figure 1.1). Les informations visuelle, auditive et somesthésique sont respectivement distribuées au cortex occipital, temporal et pariétal (Bear et al. 2002).

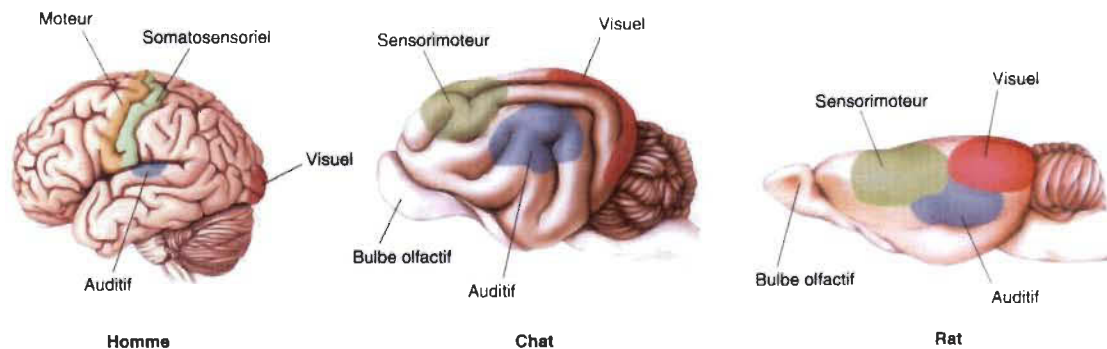


Figure 1.1 Le cortex cérébral.

Vue latérale du cortex cérébral chez l'humain, le chat et le rat. Les aires visuelles (rouge), auditives (bleu) et somesthésiques (vert) sont conservées entre les espèces. Notez leur position et l'espace utilisé par les aires associatives. Il est à noter que les images ne sont pas à l'échelle (Bear et al. 2002).

Dans cette section, les différentes voies sensorielles seront présentées, depuis les organes des sens, jusqu'au cortex cérébral. Une attention particulière sera portée sur le système visuel, principal sujet à l'étude. Pour la description des systèmes, différents ouvrages de référence en neuroanatomie ont été utilisés (Brodal 2010; Moller 2003; Nieuwenhuys et al. 2008), mais ne sont pas cités de manière exhaustive dans ce texte.

1.1.1 Le système visuel

L'expérience visuelle est initiée au niveau de la rétine, lorsqu'un photon est capté par un photorécepteur (Kefalov 2012). Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets, qui projettent vers les cellules bipolaires de centre ON et de centre OFF. Ces-dernières projettent à leur tour vers les cellules ganglionnaires de centre ON et de centre OFF, respectivement. À la noirceur, les photorécepteurs sont dépolarisés et inhibent les cellules bipolaires de centre ON mais activent les cellules bipolaires de centre OFF. En présence de lumière, photopique ou scotopique, les photorécepteurs deviennent hyperpolarisés et cessent d'inhiber les cellules bipolaires de centre ON et d'activer celles de centre OFF. Ce sont finalement les axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique pour acheminer l'information vers les différentes structures visuelles.

Chez l'humain, il y a trois types de cônes qui sont sensibles à des longueurs d'onde différentes, soit à de longues longueurs d'ondes (lumière rouge, cônes L), à des longueurs d'ondes intermédiaires (lumière verte, cônes M) et à de courtes longueurs d'ondes (lumière bleue, cônes S). Les bâtonnets sont activés en conditions scotopiques par des stimuli de faible intensité. De plus, les bâtonnets sont principalement localisés en périphérie de la rétine, alors que les cônes sont très denses dans la fovéa, la région centrale de la rétine.

Les cellules ganglionnaires de la rétine possèdent un champ récepteur, c'est-à-dire qu'elles répondent aux stimuli présentés à un endroit précis de la rétine et donc du champ visuel. Le champ récepteur est formé d'un centre et d'un pourtour qui ont une

action antagoniste l'un sur l'autre. Les cellules ganglionnaires de type ON possèdent un champ récepteur de centre-ON. Ces cellules sont donc activées lorsqu'un stimulus lumineux est aligné sur leur centre et sont inhibées lorsque ce stimulus est présenté sur leur pourtour. Les cellules ganglionnaires de type OFF ont, quant à elles, un champ récepteur de centre-OFF. Ces cellules sont alors inhibées par un stimulus lumineux présenté sur leur centre, mais activées par ce stimulus s'il est présenté sur leur pourtour.

Les projections centrales des cellules ganglionnaires rétiniennes font synapses sur des neurones de la portion dorsale du noyau géniculé latéral du thalamus. Ces neurones projettent ensuite vers le cortex visuel. Cette voie représente la principale source d'afférences visuelles au cortex cérébral chez les primates (Figure 1.2). La voie rétino-thalamique regroupe environ 90 % des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Nieuwenhuys et al. 2008). Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine nasale effectuent une décussation au niveau du chiasma optique, alors que ceux des cellules ganglionnaires de la rétine temporale traversent le chiasma optique sans croiser la ligne médiane. Le pourcentage de fibres qui croisent la ligne médiane dépend de la position des yeux. Par exemple, chez l'humain et le macaque, les yeux sont en position antérieure et environ 60 % et 50 % des axones effectuent une décussation (Perry & Cowey 1984; Perry et al. 1984). Chez la souris, les yeux sont en position latérale et la majorité (97-98 %) des axones croisent la ligne médiane au niveau du chiasme optique pour innervier les structures visuelles controlatérales (Drager 1978; Drager & Olsen 1980; Wagor et al. 1980). La voie geniculo-corticale est impliquée dans l'identification des stimuli visuels (Schneider 1967).

La deuxième principale voie visuelle ascendante se rend aux collicules supérieurs (Figure 1.2). Chez l'humain, les axones de moins de 10 % des cellules ganglionnaires de la rétine sont ainsi dirigés vers les couches superficielles du collicule supérieur, une structure située dans le toit du mésencéphale, alors que chez la souris, au moins 70 % des cellules ganglionnaires sont impliquées dans la voie rétino-tectale, ce qui en fait la principale voie visuelle ascendante chez ce modèle animal (Hofbauer & Drager 1985). Les neurones des couches superficielles du collicule supérieur envoient ensuite des

axones vers le pulvinar et/ou le noyau latéral postérieur, qui projettent à leur tour vers les aires corticales extrastriées. La voie rétino-tectale forme donc une voie extragéniculée pour acheminer des informations visuelles vers le cortex cérébral. Cette voie est impliquée dans l'orientation spatiale visuelle (Schneider 1967).



Figure 1.2 Les voies visuelles.

La majorité des efférences rétiniennes sont transmises de la rétine (1) au noyau géniculé latérodorsal (9) par la bandelette latérale du tractus optique (4). Certaines cellules ganglionnaires de la rétine envoient cependant leurs axones vers les collicules supérieurs (14) par la bandelette médiale du tractus optique. Le noyau géniculé latérodorsal et les collicules supérieurs enverront ensuite, par une voie directe ou indirecte, les informations visuelles vers le cortex visuel (Nieuwenhuys et al. 2008).

En plus de la portion dorsale du noyau géniculé latéral et des collicules supérieurs, d'autres structures, qui ne sont pas impliquées dans la formation d'images visuelles, reçoivent aussi des projections des cellules ganglionnaires de la rétine. Par exemple, certaines se terminent dans la région prétectale ou les noyaux terminaux (latéral, médial et dorsal) du système optique accessoire. Ces structures sont impliquées dans le contrôle de la motricité oculaire et de l'accommodation. D'autres se dirigent vers le noyau suprachiasmatique, dans la portion antérieure de l'hypothalamus. Cette voie rétino-hypothalamique est impliquée dans la régulation des rythmes circadiens. Plusieurs autres structures sous-corticales reçoivent aussi des afférences rétiniennes (Ling et al. 1998; Major et al. 2003; Matteau et al. 2003).

1.1.2 Les voies somesthésiques

Les informations somesthésiques sont captées par des mécanorécepteurs, sensibles aux changements de pression, des thermorécepteurs, qui détectent des variations de température, ou des nocicepteurs, sensibles à la douleur au niveau de la peau, des muscles et leurs tendons, des articulations et des viscères. Ces informations somesthésiques sont ensuite acheminées jusqu'au cortex cérébral par trois voies distinctes : la voie lemniscale médiale, la voie trigéminal et la voie spinothalamique (antérolatérale). La voie lemniscale médiale est à la base des discriminations tactiles épicrotiques et achemine aussi des informations proprioceptives. La voie trigéminal achemine au cortex l'information sensitive de la face. La voie spinothalamique est responsable de la transmission de stimuli protopathiques de la douleur, la température et des stimuli tactiles grossiers. Les informations somesthésiques sont par la suite acheminées aux noyaux ventropostérieurs médial et latéral du thalamus. Les axones des neurones de ces noyaux acheminent ensuite l'information sensorielle au cortex somesthésique primaire, au niveau du cortex pariétal.

La souris est un rongeur nocturne et elle dépend grandement de ses vibrisses pour la localisation des objets et pour la discrimination des textures (Kleinfeld et al. 2006). Chez cet animal, la voie trigéminal est donc très importante.

1.1.3 Les voies auditives

Les informations auditives sont captées par les cellules ciliées de l'organe de Corti, au niveau de l'oreille interne. Les cellules ciliées de l'organe de Corti transforment l'information auditive en influx nerveux et leurs axones se terminent dans le noyau cochléaire.

Les axones des neurones de la portion dorsale du noyau cochléaire s'assemblent pour former le lemnisque latéral, qui aboutit dans le collicule inférieur, une structure mésencéphalique. La majorité des axones des neurones du collicule inférieur forment un faisceau de fibres, le brachium du collicule inférieur, qui se termine dans le noyau géniculé médian ventral du thalamus. Ces projections se terminent sur des neurones qui projettent ensuite au cortex auditif, au niveau du lobe temporal.

Les neurones de la portion ventrale du noyau cochléaire projettent vers le corps trapézoïde, et empruntent le lemnisque latéral pour atteindre les noyaux olivaires.

1.2 Le cortex cérébral

Le rôle principal du cortex cérébral est d'analyser l'ensemble des afférences sensorielles qui y sont acheminées et de créer un percept sensoriel cohérent en intégrant les informations provenant de chacun des sens.

Dans cette section, les voies sensorielles corticales et les mécanismes d'intégration seront décrits principalement pour les voies visuelles. Bien que ces principes aient surtout été étudiés chez le primate, un parallèle sera fait avec la souris, le modèle animal utilisé pour la réalisation de cette thèse. Une attention particulière sera portée aux caractéristiques anatomiques du cortex cérébral et des circuits corticaux. Ces derniers assurent le transfert d'information entre les aires corticales qui assurent l'élaboration des différents processus cognitifs et leur organisation précise est plutôt méconnue. Cette

thèse a d'ailleurs comme principal but de caractériser la structure de ces circuits corticaux, en plus de déterminer les facteurs qui influencent leur développement.

1.2.1 Les aires visuelles corticales

Les informations visuelles arrivent dans le lobe occipital, au niveau du cortex visuel primaire. Ces informations sont par la suite acheminées aux aires extrastriées, puis aux aires associatives, afin d'assurer un traitement plus complexe de l'information visuelle (Ungerleider & Haxby 1994). L'organisation corticale des voies visuelles s'inscrit dans un modèle hiérarchique, où l'aire visuelle primaire est à la base et les aires associatives au sommet.

Les neurones du cortex visuel primaire possèdent des champs récepteurs qui sont sélectifs à l'orientation, à la direction et, puisqu'ils conservent des champs récepteurs de petite taille, préfèrent des stimuli de haute résolution spatiale, mais de faible résolution temporelle (Hubel & Wiesel 1959; Hubel & Wiesel 1962). Le traitement de l'information visuelle est donc simple au niveau de l'aire visuelle primaire et se complexifie progressivement en remontant les niveaux hiérarchiques. En effet, dans les aires visuelles extrastriées, et donc de niveau hiérarchique supérieur, la taille des champs récepteurs augmente et les propriétés fonctionnelles des neurones se complexifient (Maunsell & Newsome 1987). Ceci est accompagné par l'augmentation de la taille de l'arborisation dendritique des neurones (Elston 2002; Jacobs et al. 2001), ce qui favorise la convergence d'information sur un même neurone (Figure 1.3) (Elston 2004).

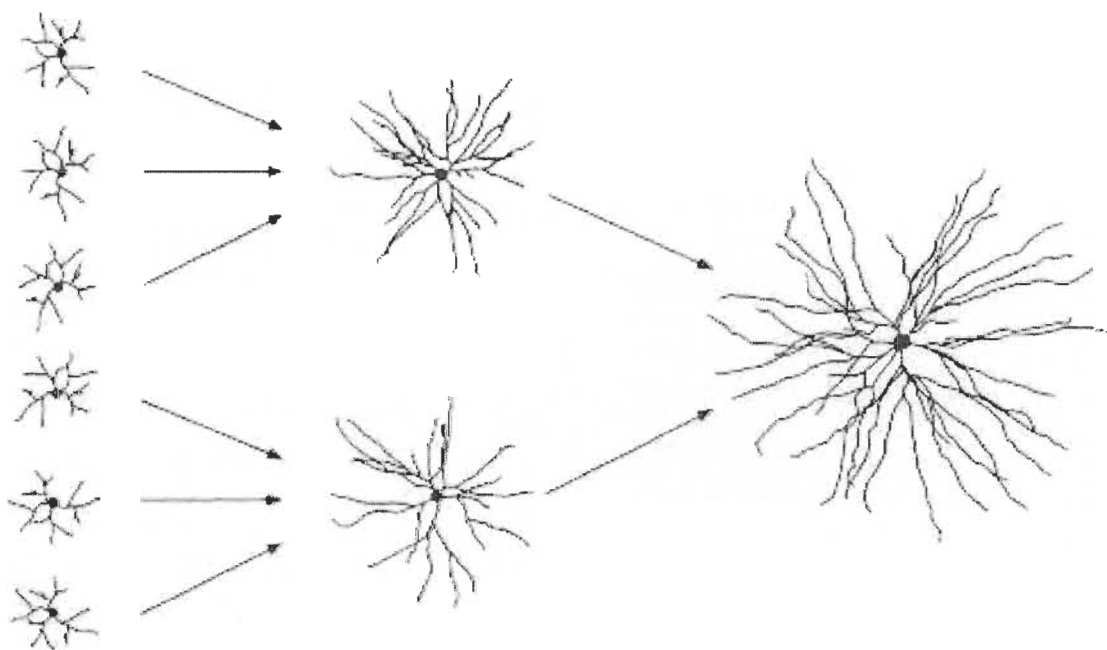


Figure 1.3 Niveaux hiérarchiques et convergence.

L'ascension des niveaux hiérarchiques est associée à une complexification de l'arborisation dendritique et à une augmentation de la taille des champs récepteurs. Ceci est rendu possible par la convergence des informations depuis l'aire visuelle primaire (à gauche), vers une aire de haut niveau hiérarchique (à droite) (Elston 2004).

Les aires visuelles extrastriées sont organisées en deux voies distinctes : la voie ventrale et la voie dorsale (Ungerleider et al. 1998; Ungerleider & Haxby 1994). L'information visuelle qui se propage le long de la voie ventrale, aussi appelée voie du « quoi », sera dirigée vers le cortex temporal. Cette voie est impliquée dans l'identification des objets. La voie dorsale, aussi connue sous le nom de voie du « où », se dirige, quant à elle, vers les aires pariétales postérieures et permet le traitement des informations spatiales et du mouvement (Figure 1.4). Il est cependant important de noter que certaines études proposent l'existence de plus d'une voie dorsale (Rizzolatti & Matelli 2003). Celle-ci serait divisée en voies ventro-dorsale et dorso-dorsale, respectivement associées à des fonctions de perception de l'espace et de coordination visuo-motrice. Les voies ventrale et dorsale convergent finalement vers le cortex préfrontal.

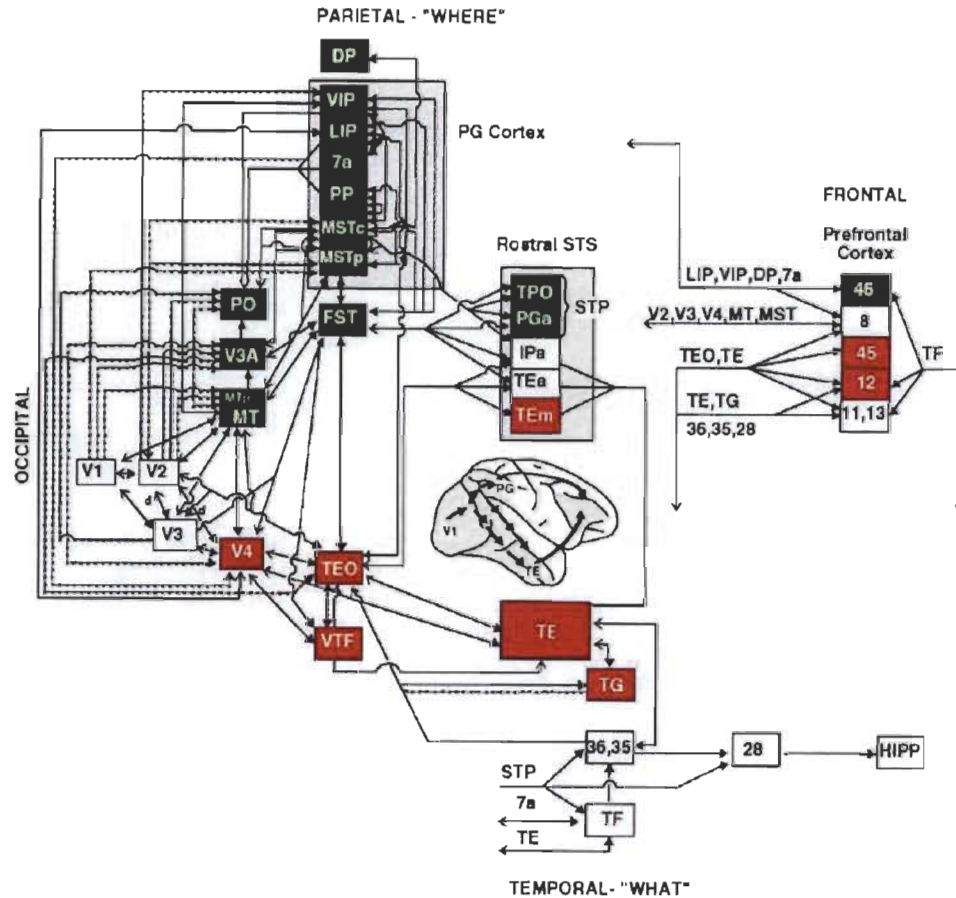


Figure 1.4 Les voies ventrale et dorsale.

En vert, les aires visuelles extrastrées qui participent à la voie dorsale et donc au traitement de l'information visuo-spatiale. Cette voie achemine l'information vers les aires associatives du lobe pariétal. En rouge, les aires visuelles extrastrées de la voie ventrale permettent de la reconnaissance des objets. L'information qui transite par ces aires est acheminée aux aires associatives du lobe temporal. Ces deux voies convergent ensuite vers le lobe préfrontal. Les lignes pleines indiquent des connexions de la portion centrale et périphérique du champ visuel, alors que les lignes pointillées correspondent à des connexions du champ visuel périphérique seulement (Ungerleider et al. 1998).

1.2.1.1 Les aires visuelles corticales chez la souris

Jusqu'au début des années 2000, les recherches effectuées sur les voies visuelles corticales étaient surtout effectuées chez le chat et le singe parce qu'on croyait que le système visuel de la souris était trop simple. Le singe, comme l'humain, possède un système visuel bien développé, avec de grands yeux, une bonne acuité visuelle, des

colonnes de dominance oculaire et de sélectivité à l'orientation et à la direction, ainsi qu'une rétine composée de cônes et de bâtonnets, ce qui lui assure une vision photopique et scotopique (Nassi & Callaway 2009). La souris, quant à elle, possède de petits yeux, une rétine dépourvue de fovéa et une forte majorité de bâtonnets (Jeon et al. 1998). Ces caractéristiques lui procurent donc une vision principalement scotopique, ainsi qu'une faible acuité visuelle (Huberman & Niell 2011). De plus, les quelques cônes retrouvés au niveau de sa rétine ne contiennent que deux types de photopigments sensibles à de courtes longueurs d'ondes (rayons ultraviolets) ou à des longueurs d'ondes intermédiaires (lumière verte) (Jacobs et al. 1991). La distribution de ces cônes au niveau de la rétine est complémentaires, c'est-à-dire que les premiers sont retrouvés dans sa portion dorsale, alors que les seconds se retrouvent dans sa portion ventrale (Calderone & Jacobs 1995; Szél et al. 1992).

Malgré les différences entre le système visuel de la souris et des primates, il y a des similarités fondamentales qui justifient l'étude de la souris. Par exemple, plusieurs études ont démontré que les neurones du cortex visuel primaire de la souris possèdent une sélectivité à l'orientation, à la direction et à certaines fréquences spatiales (Drager 1975; Gao et al. 2010; Niell & Stryker 2008), comme ce qui est retrouvé chez le chat (Hubel & Wiesel 1962) et le singe (Hubel & Wiesel 1968; Orban 2008). De plus, même si on a longtemps cru que le cortex visuel primaire de la souris n'était entouré que par deux aires visuelles extrastriées, soit une latérale et une médiale (Caviness 1975; Paxinos & Franklin 2001), on sait maintenant qu'il y a, comme chez le primate (Felleman & Van Essen 1991), plusieurs aires extrastriées distinctes (Olavarria & Montero 1989; Wang & Burkhalter 2007). Ceci a été démontré à l'aide de techniques d'imagerie optique (Schuett et al. 2002) et de différents marqueurs histologiques (Van der Gucht et al. 2007; Wang et al. 2011). Ainsi, il est maintenant admis que le cortex visuel de la souris regroupe neuf aires extrastriées, qui sont les aires : antérieure, rostrolatérale, antérolatérale, latérointermédiaire, latéromédiale, postérieure, postrhinale, antéromédiale et postéromédiale (Figure 1.5).

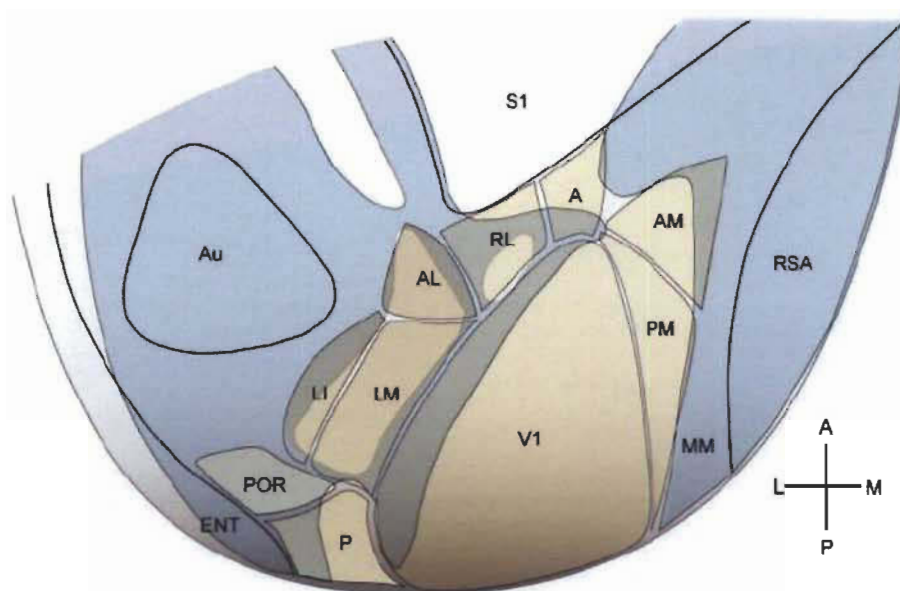


Figure 1.5 Les aires extrastriées de la souris.

Les aires visuelles secondaires médiales et latérales seraient formées de plusieurs sous-régions. Les aires latérales seraient constituées des aires A (antérieure), RL (rostrolatérale), AL (antérolatérale) LI (latérointermédiaire), LM (latéromédiale), P (postérieure) et POR (postrhinale). Les aires médiales seraient, quant à elles, constituées des aires AM (antéromédiale) et PM (postéromédiale) (Wang & Burkhalter 2007).

Chez la souris, ces aires extrastriées seraient organisées, comme chez le singe, selon un modèle hiérarchique distribué en une voie ventrale et une voie dorsale (Wang et al. 2011; 2012). Ces études ont démontré que les aires latéromédiale, et antérolatérale seraient respectivement retrouvés à la base de la hiérarchie des voies ventrale et dorsale. La voie ventrale serait par la suite complétée par les aires extrastriées latérointermédiaire, postérieure et postrhinale, alors que les aires rostrolatérale, antéromédiale, postéromédiale et antérieure seraient impliquées dans la voie dorsale (Figure 1.6).

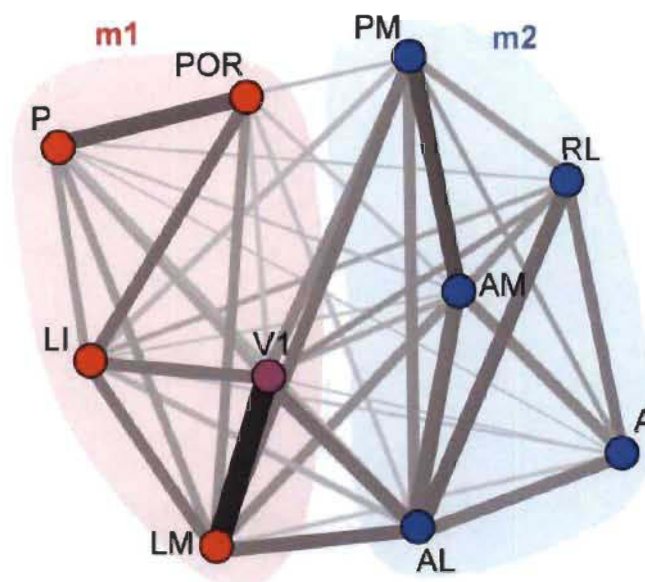


Figure 1.6 Les voies ventrale et dorsale chez la souris.

Les aires visuelles de la souris sont présentées dans une organisation corticale en réseau. Au centre, le cortex visuel primaire (V1) est fortement interconnecté avec les différentes aires extrastriées. Ces dernières sont distribuées en deux modules correspondant à la voie ventrale (en rouge) et la voie dorsale (en bleu). L'épaisseur des lignes indique la densité de connexion. La ligne gris foncé qui lie V1 à l'aire latéromédiale (LM) indique la forte liaison de V1 avec la voie ventrale. A (antérieure), AL (antérolatérale), AM (antéromédiale), LI (latérointermédiaire), LM (latéromédiale), P (postérieure), PM (postéromédiale), POR (postérolatérale) et RL (rostrolatérale) (Wang et al. 2012).

Fonctionnellement, il a été démontré que les neurones des différentes aires extrastriées de la souris possèdent des propriétés physiologiques dissemblables (Andermann et al. 2011; Marshel et al. 2011). Les neurones des aires antérolatérale, rostrolatérale et antéromédiale préfèrent des stimuli aux fréquences temporelles élevées, mais de faibles fréquences spatiales. Ces propriétés physiologiques sont optimales pour l'analyse du mouvement; elles représentent aussi des caractéristiques physiologiques typiques des neurones de la voie dorsale chez le singe (Maunsell & Newsome 1987; Nassi & Callaway 2009; Van Essen & Gallant 1994). Les neurones des aires latérointermédiaire et postéromédiale préfèrent quant à eux des stimuli aux fréquences spatiales élevées, mais de faibles fréquences temporelles. Ces propriétés physiologiques permettent de détecter les détails structuraux et les formes retrouvés dans une image;

elles sont aussi des propriétés caractéristiques des neurones de la voie ventrale chez le singe (Desimone et al. 1985; Maunsell & Newsome 1987; Nassi & Callaway 2009; Van Essen & Gallant 1994).

1.2.2 Les aires extrastriées et les connexions calleuses

Les aires extrastriées sont généralement retrouvées en périphérie du cortex visuel primaire dans des zones libres de projections calleuses. Ceci a été observé chez le primate non-humain (Van Essen et al. 1982; Zeki 1977; Zeki 1978; Zeki & Sandeman 1976) et chez différents modèles de rongeurs, dont la souris (Bravo et al. 1990a; 1990b; Laing et al. 2012; Olavarria & Montero 1984; 1989; Thomas & Espinoza 1987). Plus spécifiquement, les aires extrastriées de la souris forment des îlots qui encerclent le cortex visuel primaire (Figure 1.5) et sont distribuées dans les zones acalleuses (Figure 1.7).

Les connexions calleuses permettent de lier des aires corticales entre les deux hémisphères et elles s'organisent habituellement de manière homotopique, soit entre des régions corticales correspondantes dans les deux hémisphères cérébraux. Au niveau du système visuel, ces connexions lient les zones associées à la représentation du méridien vertical (la ligne médiale verticale du champ visuel). Ceci a été démontré chez le singe (Clarke & Miklossy 1990; Hofer et al. 2008; Rockland & Pandya 1986), le chat (Payne & Siwek 1991) et l'humain (Conturo et al. 1999; De Lacoste et al. 1985; Dougherty et al. 2005a; Dougherty et al. 2005b; Fabri et al. 2011; Hofer & Frahm 2006; Hofer et al. 2008; Park et al. 2008; Salvolini et al. 2010).

Chez la souris, la représentation du méridien vertical se trouve principalement au niveau de la bordure latérale du cortex visuel primaire (Figure 1.8) (Schuett et al. 2002; Wang & Burkhalter 2007). C'est donc pour cette raison qu'on y trouve une large bande de cellules calleuses, alors que le reste de cette aire corticale est plutôt dépourvue de connexions calleuses (Figure 1.7). Toujours chez la souris, une large zone acalleuse, entourée par des bandes de projections calleuses, est retrouvée latéralement à la bordure

latérale de l'aire visuelle primaire (Figure 1.7). Dans cette zone acalleuse, plusieurs sous-régions peuvent être retrouvées sur la base de l'agencement topographique des colonnes de projections striées-extrastriées (Wang & Burkhalter 2007); ce sont les aires extrastriées latérales. Un agencement similaire existe aussi médialement au cortex visuel primaire, où les aires extrastriées médiales sont retrouvées.

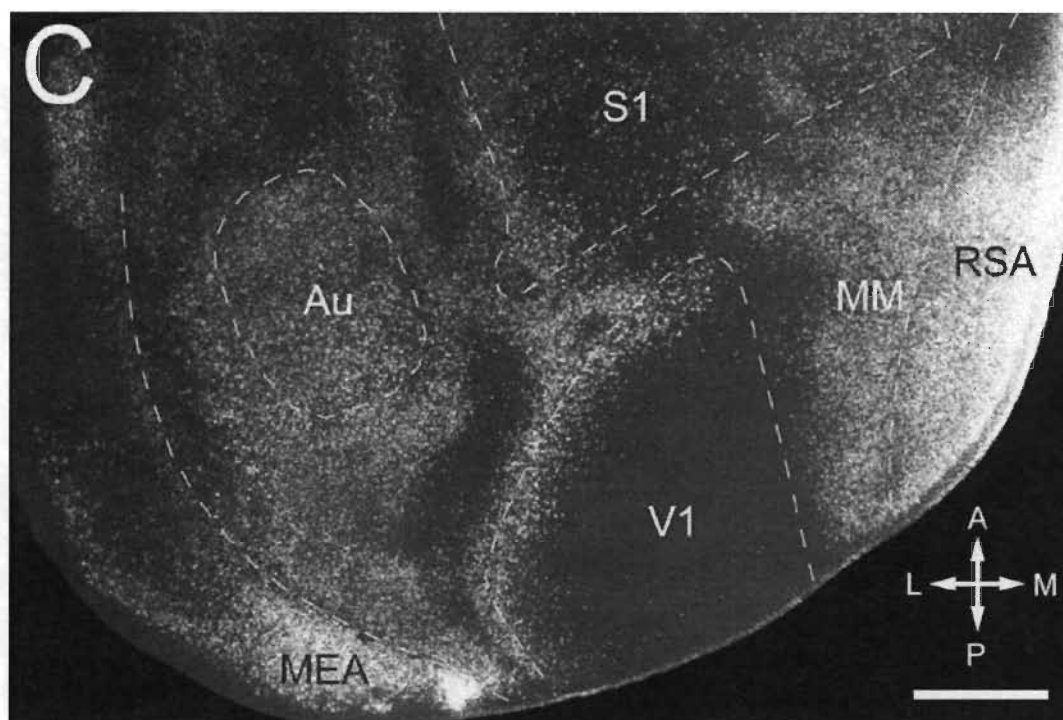


Figure 1.7 Connexions calleuses chez la souris.
Coupe horizontale du cortex postérieur gauche. Les zones claires constituent les régions calleuses entourées de zones sombres acalleuses. Au (cortex auditif), MEA (aire entorhinale médiale), MM (aire médio-médiale), RSA (cortex rétrosplénial agranulaire), S1 (cortex somesthésique primaire), V1 (cortex visuel primaire). Échelle 1 mm (Wang et al. 2007).

1.2.3 Représentation visuotopique dans les aires extrastriées

Le cortex visuel primaire et l'ensemble des aires extrastriées de la souris possèdent une représentation visuotopique complète du champ visuel. La carte rétinotopique de la souris a été cartographiée par imagerie optique (Schuett et al. 2002) et par des enregistrements électrophysiologiques (Wagor et al. 1980; Wang & Burkhalter 2007).

Le cortex visuel primaire est divisé en quatre quadrants, qui correspondent chacun à une portion du champ visuel (Figure 1.8). Comme mentionné dans la section précédente, la représentation du méridien vertical est retrouvée à la bordure latérale du cortex visuel primaire chez la souris. La représentation du méridien horizontal s'étend dans un axe médio-latéral et est retrouvée approximativement au centre du cortex visuel primaire.

Dans les aires extrastriées, la représentation visuotopique est aussi présente, mais varie de manière à ce que chacune des aires adjacentes comprenne une carte visuelle en image miroir les unes par rapport aux autres. Cette organisation en miroir permet de limiter la quantité de fibres requise pour assurer le transfert de l'information visuelle. De plus, la représentation du méridien vertical se retrouve à la bordure médiale de l'aire latéromédiale, à la bordure latérale de l'aire latéointermédiaire et de l'aire antérieure et à la frontière entre les aires antérolatérale et rostrolatérale et entre les aires antéromédiale et postéromédiale (Figure 1.8). Chacune des aires extrastriées possède aussi une représentation du méridien horizontal.

De plus, les projections du cortex visuel primaire vers les aires extrastriées conservent cette organisation topographique (Wang & Burkhalter 2007). En effet, une injection effectuée dans la portion la plus rostrale du cortex visuel primaire, et donc dans la représentation du champ visuel inférieur, résultera en des projections vers la portion la plus rostrale des aires latéromédiale et latéointermédiaire, dans la portion la plus caudale de l'aire antérolatérale, dans les portions latérales des aires rostrolatérales et antérieures et dans les portions médiales des aires antéromédiales et postéromédiales. Ceci est vrai pour chacun des quadrants du cortex visuel primaire.

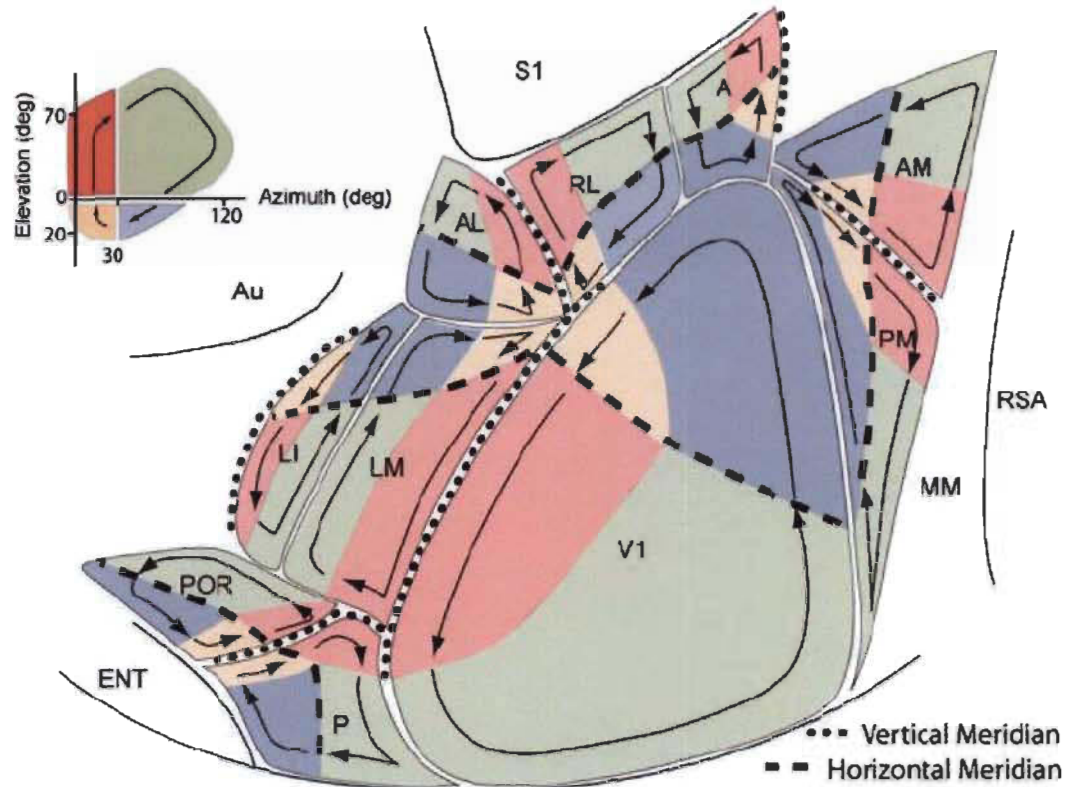


Figure 1.8 Représentation visuotopique du cortex visuel primaire et des aires extrastriées.

En haut à gauche, une représentation d'un hémichamp visuel droit est présentée. La représentation du méridien vertical est représentée par les couleurs rouge et jaune, respectivement associées à la portion supérieure et inférieure du champ visuel central. Les couleurs vertes et bleues sont quant à elles respectivement associées à la portion supérieure et inférieure du champ visuel latéral. La représentation du méridien horizontal est représentée par les tirets, alors que la représentation du méridien vertical est représentée par les pointillés. Dans le cortex visuel primaire (V1), comme dans toutes les aires extrastriées, une représentation visuotopique complète du champ visuel est retrouvée. Dans ces aires, la limite entre les zones verte et rouge et entre les zones jaune et bleue correspond à la transition entre la zone binoculaire (rouge et jaune) et la zone monoculaire (verte et bleue). Les aires extrastriées ont des représentations topographiques du champ visuel disposées en miroir l'une par rapport à l'autre (Wang & Burkhalter 2007).

1.3 Hiérarchie corticale

L'information visuelle qui est acheminée au cortex cérébral est déconstruite en ses différents paramètres (orientation, direction du mouvement, couleur, contraste, etc.). Ceux-ci sont ensuite traités par différents neurones situés dans des aires corticales organisées de manière hiérarchique (Nassi & Callaway 2009).

1.3.1 Traitement hiérarchique de l'information sensorielle

Dans les aires sensorielles primaires, les neurones possèdent des champs récepteurs de petite taille. Ceci leur permet d'effectuer un traitement simple de l'information sensorielle. Par exemple, dans le cortex visuel primaire, un neurone ne sera activé que si le stimulus est constitué de barres dont l'orientation et la direction correspondent à son orientation préférée. Ceci a été démontré pour la première fois chez le chat (Hubel & Wiesel 1959).

Avec l'ascension des niveaux hiérarchiques (voie *bottom-up*), le traitement de l'information devient plus complexe (Figure 1.9). Ceci est rendu possible par la convergence des informations, qui ont été traitées par des neurones distincts d'une aire sensorielle primaire, vers un même neurone d'une aire hiérarchiquement supérieure (Lamme & Roelfsema 2000). Cette convergence de l'information fait en sorte que la taille et la complexité des champs récepteurs des neurones s'accroissent, de manière à reconstruire l'ensemble du stimulus dans les aires situées au sommet de la hiérarchie corticale.

Des connexions descendantes (voie *top-down*) permettent de lier les aires situées au sommet de la hiérarchie corticale à celles situées dans les niveaux hiérarchiques inférieurs (Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979). Même si plusieurs considèrent que ces connexions modulent l'information retrouvée dans les aires de niveau hiérarchique inférieur (Bullier 2001), la fonction exacte de ces connexions descendantes dans la construction d'un percept sensoriel n'est pas bien comprise et fait l'objet d'un débat dans la littérature depuis une vingtaine d'années (Tong 2003).

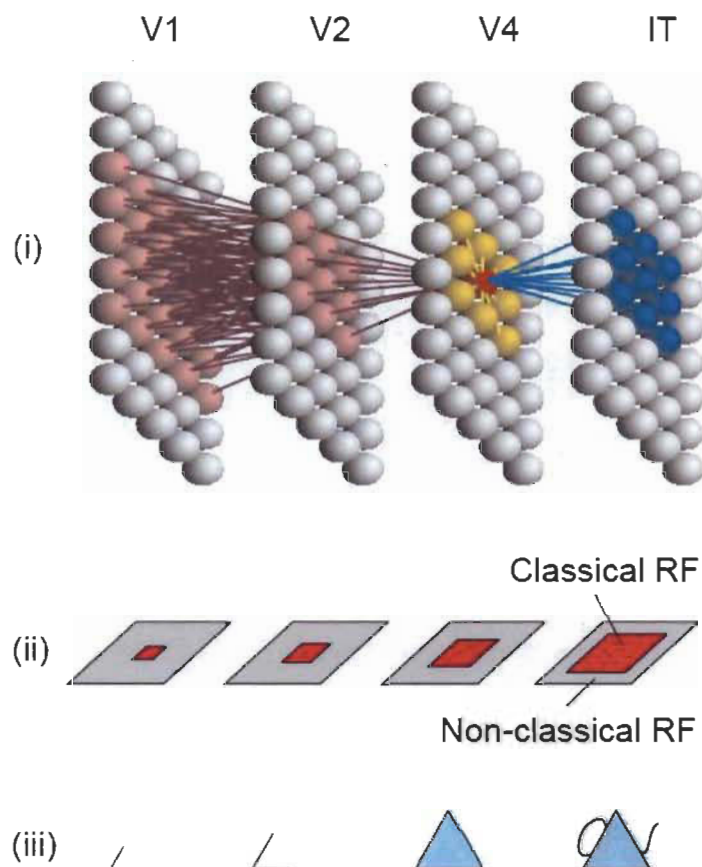


Figure 1.9 Traitement de l'information sensorielle et hiérarchie corticale.

Les neurones du cortex visuel primaire (V1) (i) envoient l'information par des connexions ascendantes (rose) vers les aires de niveau hiérarchique supérieur. Ces dernières peuvent envoyer des connexions descendantes (bleu) vers les aires de niveau hiérarchique inférieur. Les neurones du cortex visuel primaire ont des champs récepteurs de petite taille (ii) et sont sélectifs à des stimuli d'orientation préférée (iii). Avec l'ascension des niveaux hiérarchiques, les champs récepteurs s'agrandissent et le traitement de l'information se complexifie. Le stimulus complet peut ainsi être représenté dans les aires de haut niveau hiérarchique (Lamme & Roelfsema 2000).

1.3.2 Intégration multisensorielle

L'environnement n'est pas constitué d'éléments strictement unimodaux; nous sommes généralement confrontés à des stimuli multimodaux. Le cortex cérébral doit donc être en mesure d'analyser et d'intégrer les informations provenant de chacun des sens.

L'intégration multisensorielle facilite la détection des stimuli (Diederich & Colonius 2004; Rach et al. 2011) et diminue l'ambiguïté de perception (Grant & Seitz 1998; 2000; Grant et al. 1998; MacLeod & Summerfield 1987; 1990; Schwartz et al. 2004; Sommers et al. 2005).

Jusqu'à la fin des années 1990, il était cru que l'intégration multisensorielle ne survenait que dans les aires corticales associatives multimodales au sommet de la hiérarchie corticale (Figure 1.10). Selon ce modèle hiérarchique classique, les informations en provenance des différentes aires sensorielles primaires et secondaires seraient acheminées vers ces aires multisensorielles pour que l'intégration des différents stimuli se produise. Par la suite, des connexions descendantes pourraient influencer l'activité des neurones retrouvés dans les cortex de niveaux hiérarchiques inférieurs. Le transfert d'information entre les niveaux hiérarchiques serait assuré par des connexions cortico-corticales réciproques (Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979).

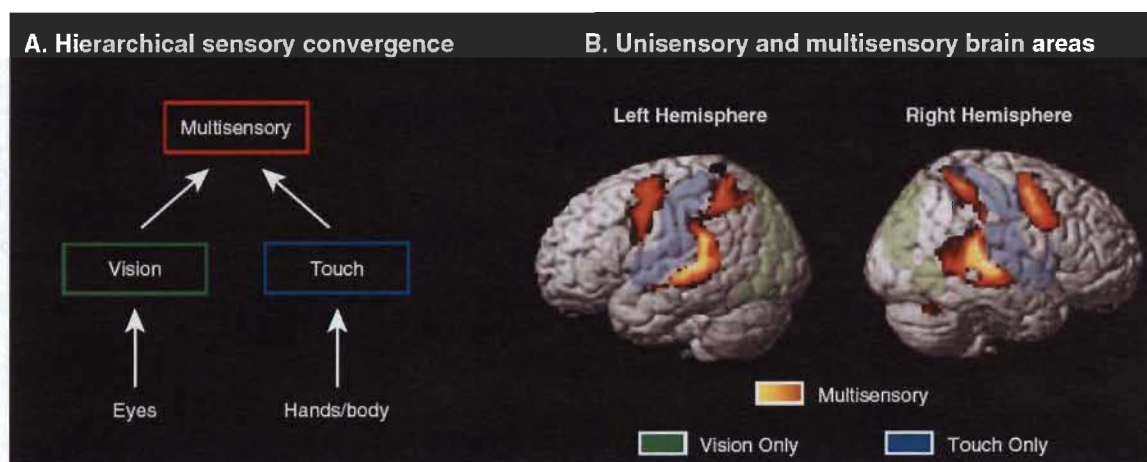


Figure 1.10 Convergence des informations sensorielles vers les aires associatives multimodales.

A) Les stimuli visuels et somesthésiques (l'audition n'est pas présentée sur cette figure) sont acheminés aux aires associatives multimodales par des voies ascendantes. B) Ces aires de niveaux hiérarchiques supérieurs sont retrouvées au niveau des lobes temporal, pariétal postérieur et frontal (Macaluso 2006).

Cependant, à la fin des années 1990, des enregistrements de potentiels évoqués dans le cortex visuel primaire ont montré une interaction audio-visuelle trop rapide pour permettre l'ascension des niveaux hiérarchiques jusqu'aux aires associatives, l'intégration multisensorielle dans ces aires et le retour de l'information audio-visuelle au niveau du cortex visuel primaire (Giard & Peronnet 1999). Les auteurs avaient alors suggéré qu'en plus du modèle classique, des connexions directes entre les aires sensorielles primaires pourraient favoriser des interactions multimodales rapides. Par la suite, d'autres études ont confirmé l'existence de ces interactions multimodales au niveau des aires primaires chez l'humain (Foxe et al. 2000; Foxe et al. 2002; Molholm et al. 2002; Murray et al. 2001; Murray et al. 2005), ainsi que chez le macaque (Fu et al. 2003; Lakatos et al. 2007; Schroeder & Foxe 2002), le chat (Allman & Meredith 2007; Meredith & Allman 2009), le furet (Bizley & King 2008; 2009; Bizley et al. 2007) et le rat (Wallace et al. 2004).

L'existence de neurones multimodaux a été démontrée à l'intérieur des aires sensorielles primaires chez le rat (Wallace et al. 2004) et le furet (Bizley & King 2008; Bizley et al. 2007), mais leur incidence est plutôt faible. Puisque les connexions cortico-corticales hétéromodales sont relativement nombreuses et que les neurones multimodaux sont rares, il a été proposé que différents types de réponses multimodales existent. Il est possible d'imaginer que les connexions hétéromodales modulent le potentiel membranaire des neurones postsynaptiques, ce qui faciliterait leur dépolarisation dans le cas d'une afférence de faible intensité, sans que le neurone ait nécessairement une réponse multimodale (Allman et al. 2008; 2009; Allman & Meredith 2007; Meredith & Allman 2009). Cette hypothèse a donné naissance au modèle de continuum de réponses multimodales (Figure 1.11).

Selon ce modèle, un neurone pourrait donc recevoir des afférences de plus d'une modalité sensorielle, par exemple A et B, et n'être activé que par le stimulus A puisque les potentiels post-synaptiques excitateurs du stimulus B ne seraient pas suffisants pour causer une réponse supraliminaire. Dans ce cas, ce neurone aurait l'apparence d'un neurone unimodal pour la modalité A. Cependant, le stimulus B pourrait moduler les

niveaux d'excitabilité du neurone postsynaptique et ainsi modifier la réponse de ce neurone pour le stimulus A (voir les exemples 2 et 3 de la Figure 1.11). Cet effet serait principalement important si les deux stimuli étaient présentés simultanément (Stein & Stanford 2008).

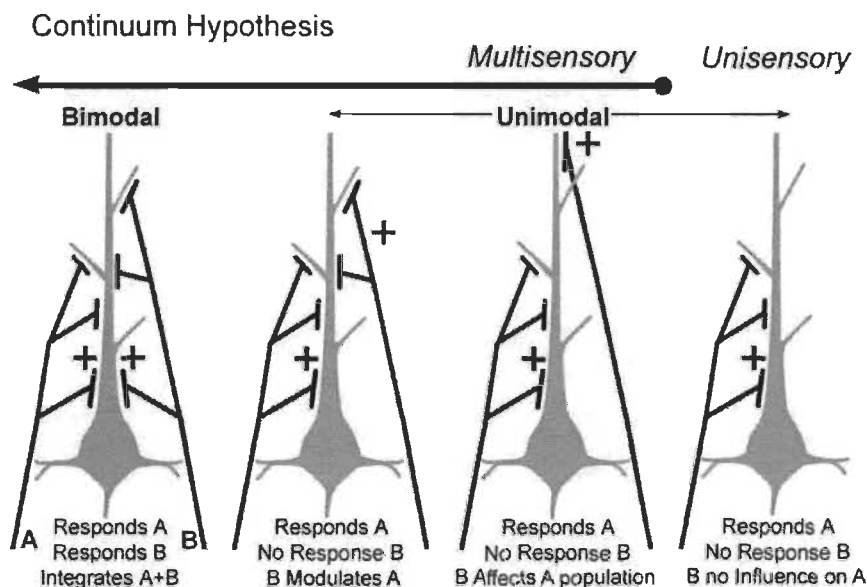


Figure 1.11 **Modèle de continuum de réponses multimodales.**

Un neurone peut recevoir des afférences d'une seule modalité sensorielle et ne dépolariser qu'en présence de stimuli de cette modalité (à droite). Il peut aussi démontrer une réponse unimodale, mais être influencé de manière plus ou moins importante par des afférences d'une aire de modalité sensorielle différente (au centre). Un neurone peut aussi être activé par des stimuli en provenance de plus d'une modalité sensorielle (à gauche) (Allman et al. 2009).

Le continuum de réponse multimodale pourrait s'expliquer par la distribution des contacts synaptiques sur l'arborisation dendritique du neurone postsynaptique. L'arborisation dendritique des neurones représente sa structure de l'algorithme d'analyse qu'il effectue (Spruston 2008) et elle comprend différents compartiments fonctionnels (Romand et al. 2011). L'effet qu'aura un contact synaptique sur un neurone dépend de sa position sur l'arborisation dendritique (Figure 1.12); plus les afférences sont situées près du corps cellulaire, plus leur effet sera grand sur le neurone postsynaptique (Williams & Stuart 2002; 2003). Dans l'exemple précédent, les afférences de A

pourraient donc être distribuées près du corps cellulaire, alors que celles de B pourraient être distribuées à des endroits plus ou moins éloignés.

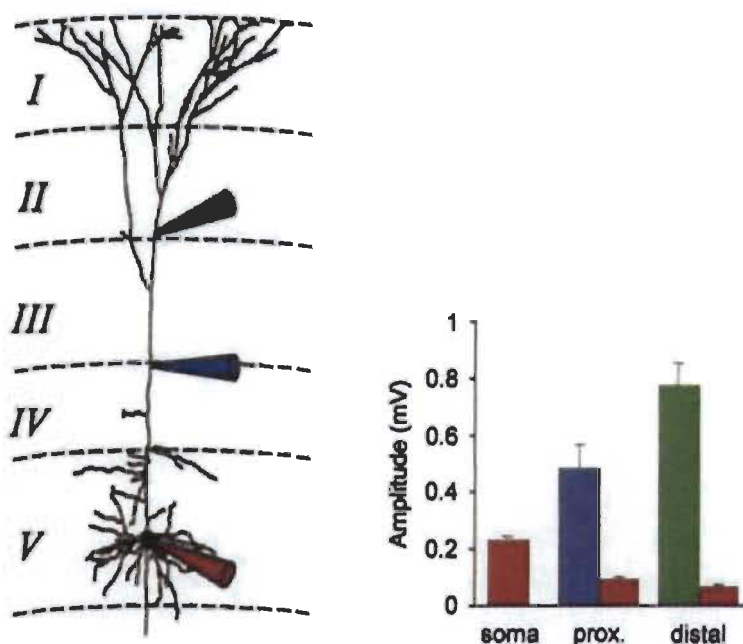


Figure 1.12 L'influence d'un contact synaptique sur un neurone dépend de sa localisation sur l'arborisation dendritique.

Des stimulations électrophysiologiques ont été effectuées à différents endroits sur la dendrite apicale d'un neurone pyramidal de la couche 5 et l'amplitude associée à chacune de ces stimulations a été enregistrée au niveau du corps cellulaire. Une stimulation effectuée au niveau du corps cellulaire entraîne une dépolarisation équivalente à cet endroit (voir barre rouge, soma). Si la stimulation est effectuée un peu plus loin sur la dendrite apicale (flèche bleue), la réponse enregistrée au corps cellulaire sera plus petite (barre rouge, prox), même si la stimulation est plus forte (barre bleue, prox). Si la stimulation est effectuée plus distalement, cet écart entre la stimulation et la réponse enregistrée au corps cellulaire s'accroît (Williams & Stuart 2002).

1.3.2.1 Intégration multisensorielle sous-corticale

Il est à noter que bien que les voies ascendantes sous-corticales soient considérées comme étant parallèles et indépendantes (voir section 1.1), les collicules supérieurs, qui forment le toit du mésencéphale, reçoivent aussi des afférences multisensorielles.

Comme il a été décrit précédemment (voir section 1.1.1), les couches superficielles des collicules supérieurs sont la cible d'un certain nombre d'axones de cellules ganglionnaires de la rétine. Cependant, des enregistrements électrophysiologiques effectués chez le lapin (Molotchnikoff et al. 1987) et le cochon d'inde (King & Palmer 1985) suggèrent que des interactions multimodales pourraient aussi survenir dans les couches superficielles des collicules supérieurs. L'origine anatomique de ces interactions n'est pas certaine. Les couches profondes des collicules supérieurs reçoivent quant à elles des afférences qui arrivent de structures sous-corticales (afférences ascendantes) et corticales (afférences descendantes) associées aux différentes modalités sensorielles et impliquées dans le mouvement (Stein & Meredith 1993). Les afférences descendantes proviennent principalement des aires sensorielles secondaires ou de niveau hiérarchique supérieur.

Les efférences des couches superficielles, intermédiaires et profondes des collicules supérieurs peuvent être ascendantes ou descendantes (Nieuwenhuys et al. 2008). Les connexions ascendantes qui proviennent des couches superficielles sont dirigées vers le noyau prétectal, la portion ventrale du noyau géniculé du thalamus, les portions inférieures et latérales du pulvinar et vers le noyau géniculé latéral. Les connexions descendantes qui proviennent de ces mêmes couches sont quant à elles principalement dirigées vers les couches intermédiaires et profondes du collicule supérieur, même si quelques fibres rejoignent la moelle épinière par le tractus tectospinal. Les efférences des couches intermédiaires et profondes des collicules supérieurs forment des connexions principalement descendantes vers le tronc cérébral et la moelle épinière. De par leurs connexions efférentes, les couches intermédiaires et profondes des collicules inférieurs, qui sont le site de l'intégration multisensorielle sous-corticale, sont donc principalement impliquées dans des tâches motrices ayant pour but d'ajuster le positionnement du corps et des organes des sens vers le stimulus (multi)sensoriel (Isa & Sasaki 2002). Les quelques fibres ascendantes se dirigent, entre autre, vers les noyaux thalamiques intralaminaires et le noyau thalamique médian-dorsal. Les neurones de ces deux noyaux thalamiques projettent ensuite vers le *frontal eye field*,

une aire corticale impliquée dans la régulation des saccades oculaires (Bruce & Goldberg 1985; Bruce et al. 1985).

1.4 Connexions cortico-corticales

Le traitement de l'information sensorielle requiert un transfert de l'information par des connexions ascendantes et descendantes entre les différentes aires corticales.

Dans un modèle hiérarchique de l'organisation corticale, les connexions *feedforward*, ascendantes, assurent le transfert d'information des aires primaires vers celles au sommet de la hiérarchie. Les connexions descendantes, *feedback*, quant à elles, acheminent l'information d'une aire de haut niveau hiérarchique vers une aire de plus bas niveau. Un troisième type de connexion, les connexions latérales, permet de lier des neurones d'une même aire corticale.

Ces connexions ont été caractérisées pour la première fois chez le singe (Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979). Les connexions *feedforward* proviennent des couches supragranulaires et se terminent au niveau de la couche granulaire (couche 4) de l'aire qui les reçoit. Les connexions *feedback* prennent origine de neurones des couches infragranulaires et les terminaisons axonales peuvent être retrouvées dans les couches supragranulaires et infragranulaires. Finalement, les connexions latérales proviennent des couches supragranulaires et infragranulaires (Felleman & Van Essen 1991) et terminent sur l'ensemble des couches corticales. Ces connexions latérales forment des connexions locales intracorticales (Bullier 2001).

Chez le rongeur, le patron de distribution laminaire des neurones d'origine et des terminaisons axonales des connexions *feedback* et latérales est conservé, mais celui des connexions *feedforward* est légèrement différent (Coogan & Burkhalter 1990). En effet, les terminaisons des axones participant aux connexions *feedforward* peuvent envahir l'ensemble des couches corticales, même si elles sont principalement denses au niveau de la couche 4.

Les propriétés physiologiques des connexions *feedforward* et *feedback* ont aussi été caractérisées. Chez le singe, il a été démontré que ces connexions possèdent une vitesse de conduction comparable et significativement plus rapide que les connexions latérales (Bullier 2001). Les connexions *feedforward* et *feedback* diffèrent cependant en ce qui a trait aux populations neuronales qui sont la cible de leurs terminaisons axonales. Des études de microscopie électronique effectuées chez le rat ont montré que les connexions *feedback* ciblent des populations neuronales postsynaptiques excitatrices dans une proportion plus importante que les connexions *feedforward* (98 % versus 90 %) (Johnson & Burkhalter 1996; 1997). Tel que démontré chez le singe, les connexions *feedback* semblent aussi exercer une fonction de modulation sur les niveaux d'excitabilité des neurones postsynaptiques, alors que les connexions *feedforward* ont plutôt une action inductrice (*driver*) (Bullier 2001). Des études récentes effectuées chez la souris ont cependant montré que ces connexions n'ont pas une fonction strictement dichotomique sur les neurones postsynaptiques; les deux types de connexion peuvent effectuer des connexions inductrices et modulatrices (Covic & Sherman 2011; De Pasquale & Sherman 2011).

1.5 Facteurs qui influencent le développement des circuits corticaux

Le développement du cortex cérébral pendant la phase embryonnaire nécessite la participation de plusieurs facteurs intrinsèques. Ceux-ci assureront la mise en place des différentes aires corticales, mais aussi des ébauches des circuits corticaux. Des facteurs extrinsèques pourront, par la suite, affiner ces structures.

1.5.1 Facteurs intrinsèques

1.5.1.1 Le développement de la carte corticale

Pendant le développement embryonnaire, une série de gènes de segmentation, les homéogènes, sont exprimés le long de la ligne primitive de l'embryon (Larsen 2003). Ces gènes assurent la régionalisation du système nerveux central et leur expression est

régulée par différentes molécules de signalisation qui sont sécrétés au niveau de centres organisateurs (Sanes et al. 2012).

Un de ces centres organisateurs est retrouvé à l'extrémité crâniale du tube neural; soit le centre organisateur rostral, aussi connu sous le nom de plaque commissurale (Figure 1.13). Ce dernier est responsable de l'expression de facteurs de la famille des *fibroblast growth factors* (Fgf) (Shimamura & Rubenstein 1997). L'expression des Fgf depuis la plaque commissurale s'effectue dans un axe crânio-caudal et selon un gradient, avec un niveau d'expression maximale à l'extrémité crâniale (Storm et al. 2006). Deux autres centres organisateurs, soit le centre dorsal et le centre ventral, participent aussi à la régionalisation du prosencéphale en sécrétant respectivement les *bone morphogenic proteins* (BMP) et les molécules de la famille Wnt, ainsi que *Sonic hedgehog* (Shh) (Crossley et al. 2001; Shimamura & Rubenstein 1997; Shimogori et al. 2004). Le centre dorsal semble être particulièrement important pour la régionalisation du télencéphale (Cheng et al. 2006).

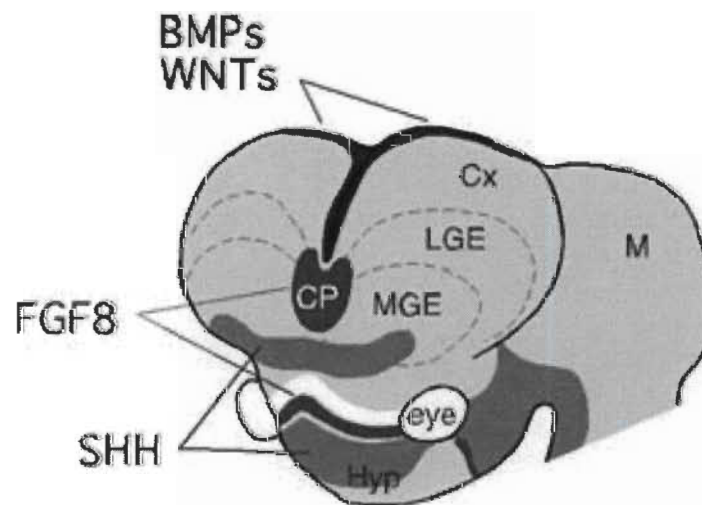


Figure 1.13 Les centres organisateurs du prosencéphale.

Trois centres organisateurs sont retrouvés au niveau du prosencéphale. Le plus crânial est le centre organisateur rostral, ou plaque commissurale (CP). Il est spécialisé dans l'expression de facteurs de la famille des Fgf. Le second centre organisateur est le centre dorsal. Il exprime les molécules de la famille des BMP et des Wnt. Le troisième centre organisateur est le centre ventral. Ce dernier exprime principalement les molécules de la famille de Shh (Rubenstein 2011).

Ces différentes molécules de signalisation régulent à leur tour l'expression des homéogènes responsables de la régionalisation du télencéphale (O'Leary et al. 2007). Deux homéogènes sont particulièrement importants pour la mise en place des différentes aires corticales et pour définir leur taille; il s'agit de *Pax6* et de *Emx2* (Bishop et al. 2000; Bishop et al. 2002; O'Leary & Nakagawa 2002; Pallas 2001; Rash & Grove 2006). Leur expression s'effectue selon des gradients inverses et complémentaire qui prennent respectivement naissance au pôle caudo-médial et rostro-latéral (Figure 1.14) (Bishop et al. 2000; 2002; O'Leary & Nakagawa 2002; Pallas 2001; Rash & Grove 2006). Une altération dans les niveaux d'expression de ces homéogènes entraînera une réorganisation de la carte corticale. Par exemple, une expansion des aires rostrales au détriment des aires caudales a été observée chez des souris *Emx2*^{-/-}, alors que l'effet inverse se produit chez des souris *Pax6*^{-/-} (Bishop et al. 2000).

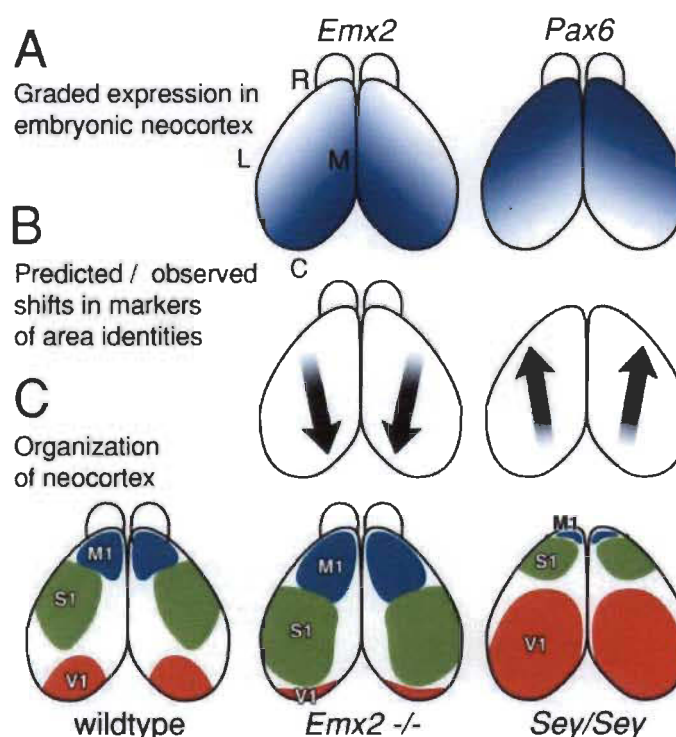


Figure 1.14 Le rôle des homéogènes *Emx2* et *Pax6*.

A) Les homéogènes *Emx2* et *Pax6* sont exprimés sous forme de gradient qui prend respectivement naissance au pôle caudo-médial et rostro-latéral du cortex cérébral en formation. B-C) Lorsque l'expression de l'un de ces homéogènes fait défaut, la régionalisation des aires corticales est altérée (Muzio & Mallamaci 2003).

1.5.1.2 Le développement de la structure axonale

À l'échelle cellulaire, la structure des axones est dépendante de facteurs attractifs et répulsifs que leurs cônes de croissances rencontrent. Ces facteurs peuvent être de longue ou de courte distance et ils déterminent à quel endroit les axones distribuent leurs arborisations terminales (Molnár et al. 2012). La reconnaissance des structures cibles et l'entrée des cônes de croissances dans celles-ci nécessitent la participation de plusieurs mécanismes moléculaires qui contrôlent la croissance et la survie des axones.

Dans les systèmes sensoriels, une topographie précise est retrouvée dans les différentes structures sous-corticales et corticales (voir section 1.1). Les éphrines et leurs ligands assurent la conservation de la topographie entre les structures. Ceci a été démontré pour la première fois avec des axones rétino-tectaux (Cheng et al. 1995; Drescher et al. 1995). De plus, les axones des neurones pyramidaux ciblent différentes couches corticales selon leur couche cellulaire d'origine et selon le type de connexion à laquelle ils participent (voir section 1.4). Les éphrines semblent aussi responsables de la distribution de leurs arborisations terminales dans les différentes couches corticales (Castellani & Bolz 1999; Castellani et al. 1998; Mann et al. 2002).

1.5.2 Facteurs extrinsèques

Les circuits corticaux qui sont mis en place pendant le développement embryonnaire sont généralement exubérants. L'expérience sensorielle sera nécessaire pour affiner ces circuits et éliminer les synapses superflues (Katz & Shatz 1996; Price et al. 2006).

Chez l'embryon, des vagues d'activité spontanée parcourent la rétine en développement. Ces vagues d'activité rétinienne sont impliquées dans l'élaboration de l'organisation rétinotopique (Butts et al. 2007; Butts & Rokhsar 2001), et dans la ségrégation des afférences rétinienne au niveau des structures visuelles (Butts et al. 2007; Shatz & Stryker 1988; Stryker & Harris 1986; Warland et al. 2006). Une altération de cette activité entraîne des modifications importantes dans le développement

du système visuel. Par exemple, limiter l'activité cholinergique de la rétine pendant le développement prénatal affecte la ségrégation des afférences rétiniennes au niveau de la portion dorsale du noyau géniculé latéral du thalamus et du collicule supérieur (2011a; Dhande et al. 2011b; Xu et al. 2011) et diminue la spécificité rétinotopique dans l'axe naso-temporal au niveau du noyau géniculé latérodorsal (Grubb et al. 2003). Le blocage de l'activité spontanée de la rétine empêche aussi la rétraction des afférences rétino-géniculées exubérantes (Cook et al. 1999; Hooks & Chen 2006), induit une topographie anormale de ces afférences rétiniennes au niveau du noyau géniculé latérodorsal du thalamus (Chapman 2000; Huberman et al. 2003) et provoque l'absence de colonnes de dominance oculaire dans le cortex visuel primaire (Chapman et al. 1986; Stryker & Harris 1986).

Au cours du développement postnatal, les différents systèmes possèdent une période de grande plasticité corticale, pendant laquelle les circuits sont très malléables; il s'agit de la période critique. Chez l'humain, cette période persiste jusqu'à l'adolescence. Par la suite, un certain niveau de plasticité persiste, mais les circuits sont beaucoup plus rigides. Les mécanismes sous-jacents à l'ouverture et à la fermeture de la période critique ont principalement été étudiés dans le système visuel (Hensch 2005).

Dans les deux prochaines sections, nous nous intéresserons aux facteurs extrinsèques qui participent à l'élaboration des circuits corticaux. Une attention particulière sera portée à l'effet de l'expérience visuelle postnatale sur l'organisation de ces circuits corticaux.

1.5.2.1 La cécité et les connexions cortico-corticales

L'effet d'une déprivation sensorielle sur le développement des circuits corticaux a été étudié de manière intensive chez les individus aveugles. Ceux-ci ont des facultés sensorielles non-visuelles améliorées. Ils sont effectivement plus performants que les individus voyants pour localiser des sons périphériques (Despres et al. 2005; Fieger et al. 2006; Roder et al. 1999; Voss et al. 2004), ou des stimuli monauraux (Gougoux et al.

2005; Lessard et al. 1998; Voss et al. 2008). Ils ont aussi une meilleure résolution temporelle de détection des stimuli auditifs (Stevens & Weaver 2005; 2007) et peuvent discriminer plus facilement des variations de fréquence sonore (Gougoux et al. 2004). Par contre, même s'ils détectent plus rapidement les stimuli auditifs (Elbert et al. 2002; Niemeyer & Starlinger 1981; Roder et al. 1996; 2000), leurs seuils de détection ne sont pas différents de ceux retrouvés chez les individus voyants (Niemeyer & Starlinger 1981; Starlinger & Niemeyer 1981). Quant aux informations somesthésiques, en plus de posséder une meilleure résolution spatiale pour la détection des stimuli tactiles (Van Boven et al. 2000) les aveugles détectent plus facilement des stimuli vibrotactiles (Wan et al. 2010) que les individus voyants. Finalement, ils démontrent aussi des performances améliorées pour la détection (Beaulieu-Lefebvre et al. 2011; Cuevas et al. 2009) et l'identification (Cuevas et al. 2009; Rosenbluth et al. 2000) de stimuli olfactifs.

Plusieurs études ont démontré chez les aveugles l'implication du cortex occipital dans l'exécution de ces tâches auditives (Burton et al. 2002b; Collignon et al. 2011; 2009; Gougoux et al. 2005; Hertrich et al. 2009; 1997; Kujala et al. 1992; 1995; 2005; Leclerc et al. 2000; Voss et al. 2006; Wanet-Defalque et al. 1988; Weaver & Stevens 2007; Weeks et al. 2000), somesthésiques (Burton et al. 2002a; Cohen et al. 1997; Goyal et al. 2006; Sadato & Hallett 1999; 2004; 1998; Sadato et al. 1996; Wanet-Defalque et al. 1988; Weaver & Stevens 2007) et olfactives (Kupers et al. 2011), ce qui pourrait expliquer ces capacités non-visuelles exacerbées. De plus, perturber le cortex occipital par une stimulation magnétique transcrâniale rend impossible la lecture du Braille chez l'aveugle (Cohen et al. 1997), ce qui démontre son implication fonctionnelle dans le traitement des informations non-visuelles.

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'activation des aires occipitales pour le traitement d'informations non-visuelles chez les aveugles (Bavelier & Neville 2002). La première hypothèse implique des réorganisations sous-corticales. Il a d'ailleurs été démontré chez des animaux souffrant d'anophtalmie congénitale ou ayant un système visuel peu développé, que les collicules inférieurs projettent vers la portion dorsale du noyau géniculé latéral thalamus (2008; Chabot et al. 2007; Doron &

Wollberg 1994; Piche et al. 2004). La deuxième hypothèse consiste en une réorganisation des circuits corticaux intermodaux. Les aires auditives et somesthésiques envoient des projections directes vers le cortex visuel primaire chez l'animal voyant, tel que l'humain (Beer et al. 2011), le macaque (Borra & Rockland 2011; Clavagnier et al. 2004; Falchier et al. 2002; Rockland & Ojima 2003), le chat (Hall & Lomber 2008; Innocenti et al. 1988), la souris (Charbonneau et al. 2012; Larsen et al. 2009) et le campagnol des prairies (Campi et al. 2010). Il a été proposé que ces connexions soient amplifiées chez les aveugles, de manière à augmenter la quantité d'information non-visuelle pouvant être acheminée au cortex occipital. Des études réalisées chez l'humain (Klinge et al. 2010; Wittenberg et al. 2004) et l'opossum (Kahn & Krubitzer 2002; Karlen et al. 2006) semblent valider cette hypothèse. Par contre, chez la souris, l'anophtalmie congénitale et l'énucléation dès la naissance n'entraînent pas d'accroissement du nombre de neurones impliqués dans ces connexions comparativement à la souris voyante (Charbonneau et al. 2012). Des résultats similaires ont aussi été observés chez un modèle de souris dépourvu de bâtonnets au niveau de la rétine (Larsen et al. 2009). La dernière hypothèse propose plutôt que ces circuits corticaux soient démasqués chez l'aveugle par des modifications synaptiques (Pascual-Leone et al. 2005; Pascual-Leone & Hamilton 2001). Ce démasquage pourrait survenir suite à une diminution des niveaux d'inhibition dans les aires occipitales, à une augmentation du nombre d'afférences excitatrices ou à une modification de la distribution de ces afférences sur les différents compartiments dendritiques (Williams & Stuart 2002; 2003).

1.5.2.2 Effet d'une déprivation visuelle sur les connexions striées-extrastriées et les projections calleuses

L'expérience sensorielle semble aussi affecter l'organisation des circuits corticaux du système visuel. Il a été démontré chez des rats énucléés à la naissance et souffrant d'anophtalmie congénitale que l'expérience visuelle était nécessaire pour la mise en place de connexions striées-extrastriées normales. Dans les deux cas, le patron de distribution des projections du cortex visuel primaire vers les aires extrastriées était anormal (Bravo & Inzunza 1994; Laing et al. 2012). De plus, comme il a été démontré

dans ces deux études, plus la cécité survient tôt, plus la distribution de ces connexions est altérée. En effet, l'anophtalmie résulte en des bandes de projections fusiformes qui permettent difficilement la reconnaissance des aires extrastriées (Bravo & Inzunza 1994), alors que l'énucléation provoque un élargissement des zones de projections (Bravo & Inzunza 1994; Laing et al. 2012). Ces résultats chez le rat énucléé et anophtalme démontre une diminution de la spécificité de la topographie des connexions striées-extrastriées chez l'aveugle.

Les connexions calleuses ont souvent été utilisées comme modèle pour étudier l'effet de l'expérience sensorielle sur le développement des circuits corticaux. Comme pour l'ensemble des connexions thalamo-corticales et cortico-corticales, le développement normal des connexions calleuses commence par la mise en place de connexions exubérantes qui sont ensuite affinées par l'expérience sensorielle (Innocenti & Price 2005).

Chez des animaux privés d'afférences visuelles, les zones de projection calleuses entre les aires visuelles des deux hémisphères sont désorganisées et ce sont principalement les couches supragranulaires qui sont affectées (Frost et al. 1990; Innocenti et al. 1985). Ceci a été observé chez le chat (Boire et al. 1995; Bourdet et al. 1996; Frost & Moy 1989; Frost et al. 1990; Innocenti & Frost 1979; 1980; Innocenti et al. 1985), le furet (Bock et al. 2012), le rat (Abel & Olavarria 1996; Chang et al. 1995; 1988; Olavarria & Li 1995; Olavarria et al. 1987; Olavarria & Hiroi 2003; Olavarria & Safaeian 2006), le hamster (O'Brien & Olavarria 1995; Rhoades & Dellacroce 1980; Rhoades et al. 1987) et la souris (Olavarria & Van Sluyters 1984; Olavarria & Hiroi 2003; Rhoades et al. 1984).

Plus spécifiquement chez la souris, l'énucléation à la naissance entraîne un élargissement médial de la bande de projections située à la bordure latérale du cortex visuel primaire et l'anophtalmie entraîne un dédoublement de cette bande (Olavarria & Van Sluyters 1985; Rhoades et al. 1984). Les zones normalement acalleuses sont aussi envahies par des îlots de projections calleuses chez les souris privées d'afférences visuelles.

1.5.3 Des facteurs qui influencent la morphologie neuronale

La morphologie des neurones pyramidaux semble être influencée par divers facteurs. Certaines études ont démontré que la modalité sensorielle pouvait déterminer la complexité de l'arborisation dendritique. Par exemple, les neurones du cortex somesthésique sont généralement plus complexes que ceux du cortex visuel (Benavides-Piccione et al. 2006) et que ceux du cortex auditif (Groh et al. 2010). D'autres études ont démontré que la hiérarchie corticale est aussi un facteur déterminant, puisque l'arborisation dendritique se complexifie avec l'ascension des niveaux hiérarchiques (Elston & Rosa 1997; 1998a; 1998b; 2000; Elston et al. 1996).

De plus, les neurones pyramidaux de la couche 5 qui projettent vers les régions sous-corticales sont caractérisés par une dendrite apicale très volumineuse et très arborisée, alors que ceux qui projettent vers d'autres régions corticales ont une dendrite apicale plus simple et/ou plus courte (Games & Winer 1988; Hallman et al. 1988; Hubener & Bolz 1988; Hubener et al. 1990; Kasper et al. 1994; Larsen et al. 2007; Schofield et al. 1987). Dans la population de neurones qui effectuent des connexions cortico-corticales, il a été démontré que ceux qui participent à des connexions calleuses possèdent aussi une morphologie dendritique plus complexe que ceux qui effectuent des connexions ipsilatérales (Soloway et al. 2002).

1.6 Objectifs et hypothèses de recherche

1.6.1 Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux

Étant donné que le cortex visuel primaire projette vers les aires extrastriées, retrouvées dans des zones acalleuses (Coogan & Burkhalter 1993) et que le patron de connexions calleuses est altéré chez les animaux adultes déprivés visuellement depuis la naissance (Olavarria & Van Sluyters 1984; Rhoades et al. 1984) et anophtalmes (Rhoades et al. 1984), la disposition des aires extrastriées en périphérie de l'aire visuelle primaire pourrait être altérée chez les souris aveugles. Afin de déterminer l'effet de

l'expérience visuelle sur les circuits corticaux, nous étudierons donc la disposition des aires extrastriées chez des souris voyantes, énucléées et anophtalmes, en comparant la topographie des projections du cortex visuel primaire vers ces aires.

En plus d'entraîner une désorganisation des connexions calleuses visuelles qui marquent la position de la représentation visuotopique du méridien vertical, la déprivation visuelle altère la distribution et la taille relative des projections striées-extrastriées (Bravo & Inzunza 1994; Laing et al. 2012). Ces deux effets de la déprivation pourraient être liés par des mécanismes communs qui contrôlent le développement de la représentation visuotopique dans le cortex visuel et les aires visuelles extrastriées. Nous proposons donc que ces mécanismes se manifestent de deux manières. Premièrement, il est possible que l'activité visuelle affecte la distribution des cellules calleuses et la distribution des projections striées-extrastriées et que ces deux distributions soient interdépendantes. Deuxièmement, il est aussi possible que le développement ces deux distributions soient influencées par l'activité sensorielle, mais par des mécanismes indépendants.

Les résultats de cette étude permettront de déterminer quels facteurs (intrinsèques et/ou extrinsèques) sont impliqués dans le développement de ces connexions cortico-corticales et de mieux comprendre comment les réseaux corticaux sont mis en place pendant le développement. Ces travaux sont présentés sous forme de manuscrit au Chapitre 3.

1.6.2 Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels

Étant donné que les aires extrastriées reçoivent des connexions directes en provenance de l'aire auditive primaire (Budinger et al. 2000; Budinger et al. 2006), que le cortex visuel secondaire latéral est fortement activé chez le rat lorsqu'un stimulus audio-visuel est présenté (Hirokawa et al. 2008) et que les aires visuelles secondaires sont réciproquement connectées avec le cortex visuel primaire, nous croyons qu'une connexion indirecte pourrait exister. Nous étudierons donc les zones de convergence

entre des neurones de l'aire visuelle secondaire latérale qui projettent vers le cortex visuel primaire et des axones auditifs qui se terminent dans l'aire visuelle secondaire, afin de démontrer l'existence d'une connexion indirecte audio-visuelle. Pour visualiser cette connexion, nous injecterons un traceur viral rétrograde qui marque complètement l'arborisation dendritique de neurones dans le cortex visuel primaire et un traceur antérograde dans le cortex auditif primaire.

De plus, étant donné que l'activité auditive est augmentée dans l'aire visuelle secondaire latérale chez les souris énucléées (Chabot et al. 2007), l'effet de l'activité sensorielle sur le développement de cette connexion indirecte sera aussi étudié. Nous croyons que cette connexion pourrait être réorganisée, à l'échelle microstructurale, chez les souris énucléées. Plus précisément, la perte d'afférences visuelles tôt dans le développement pourrait entraîner des changements dans le nombre de contacts synaptiques auditifs et/ou leur distribution sur l'arborisation dendritique du neurone qui les reçoit. Ceci pourrait entraîner un démasquage de cette connexion normalement silencieuse. Nous cartographierons donc les afférences auditives sur l'ensemble de l'arborisation dendritique des neurones du cortex visuel secondaire latéral impliqués dans cette connexion indirecte.

Ces résultats, présentés sous forme d'article au Chapitre 4, permettront de démontrer l'existence de connexions indirectes à l'échelle cellulaire et de mieux comprendre les effets de l'expérience sensorielle sur le développement de la microcircuiterie corticale.

1.6.3 Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticale descendante

Étant donné que les connexions *feedback* sont formées par plusieurs neurones qui proviennent des couches infragranulaires (5 et 6) et qui projettent vers les couches supragranulaires et infragranulaires (Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979) et que ces connexions peuvent avoir à la fois des propriétés électrophysiologiques de type inductrice et modulatrice (Covic & Sherman 2011; De Pasquale & Sherman

2011), nous croyons que les neurones qui participent à une connexion *feedback* pourraient former une population hétérogène.

Étant donné l'importance des neurones pyramidaux de la couche 5 dans les circuits *feedback* (Bai et al. 2004), nous allons nous concentrer sur ce sous-groupe de neurones de projection. Nous nous intéresserons aux neurones pyramidaux de la couche 5 qui proviennent d'aires corticales de modalité sensorielle, de hiérarchie et d'hémisphères différents et qui projettent vers le cortex visuel primaire. Étant donné les corrélations entre leur morphologie dendritique et la modalité sensorielle (Benavides-Piccione et al. 2006; Groh et al. 2010), le niveau hiérarchique (Elston & Rosa 2000) de l'aire où ils se retrouvent et le type de connexions cortico-corticale qu'ils effectuent, soit calleuses ou ipsilatérales (Soloway et al. 2002), ces neurones pourraient former des groupes morphologiquement distincts. La relation entre la morphologie dendritique et la modalité sensorielle, la hiérarchie corticale et la latéralité n'a jamais été étudiée pour une connexion vers une cible corticale connue. L'existence d'une hétérogénéité morphologique indiquerait une diversité de canaux fonctionnels au sein d'une même connexion *feedback*. Nous comparerons donc l'arborisation dendritique de neurones pyramidaux de la couche 5 impliqués dans des connexions *feedback* homomodales et hétéromodales vers le cortex visuel primaire. La stratégie d'étudier l'arborisation dendritique d'une population neuronale a déjà été utilisée pour démontrer la diversité des types neuronaux retrouvés à l'intérieur d'une même aire corticale (Chen et al. 2009; Tsiola et al. 2003). Dans cette étude, nous supposons que différents types de connexions *feedback* existent et qu'ils sont influencés par la modalité sensorielle, la hiérarchie et la latéralité de l'aire d'où ils proviennent.

Ces résultats, présentés sous forme d'article au Chapitre 5, devraient permettre de mieux comprendre la structure des microcircuits corticaux et d'identifier les facteurs déterminant leur organisation.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Modèles animaux

Les études effectuées chez l'humain sont nécessairement restreintes à des techniques peu invasives, telles que l'imagerie fonctionnelle, l'enregistrement de potentiels évoqués, la tomographie par émission de positron et la tractographie par IRM de diffusion. Ces techniques permettent d'identifier les régions corticales activées par diverses tâches et, dans le cas de la tractographie, de voir les réseaux de fibres, mais ne permettent pas d'apprécier les substrats anatomiques à l'échelle cellulaire. Dans cette thèse, l'organisation de la microcircuiterie cortico-corticale sera étudiée dans l'optique d'améliorer la compréhension des réseaux corticaux. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux, chez qui des méthodes plus invasives peuvent être employées. Deux souches de souris ont été utilisées dans nos travaux : la souris C57BL/6 et la ZRDCT/An.

2.1.1 Souris C57BL/6

La souche de souris C57BL a été créée en 1921, par un croisement effectué par Dr C.C Little, le fondateur de la compagnie Jackson Laboratory. Ce croisement a donné naissance à diverses souches de souris C57BL, dont la souche C57BL/6 (Watkins-Chow & Pavan 2008).

La souris de souche C57BL/6 est parmi celles les plus utilisées dans la recherche biomédicale (Bryant 2011). Son génome a été séquencé (Waterston et al. 2002) et dans le cadre du « NIH Mouse Genome Knockout Project », elle est maintenant utilisée pour créer différentes lignées de souris knock-out pour certains gènes. De plus, depuis 2003, plusieurs scientifiques du domaine des neurosciences, de la biologie moléculaire, des

ingénieurs et informaticiens travaillent de concert pour le développement d'un atlas complet de son protéome et de son connectome (Allen Brain Institute for Brain Science).

L'utilisation d'une souche de souris pigmentée était nécessaire dans cette thèse puisque plusieurs anomalies du système visuel ont été observées chez des animaux albinos. Par exemple, la rétine des animaux hypopigmentés présente un déficit de bâtonnets et les cellules ganglionnaires de la rétine projettent de manière anormalement élevée vers les structures de l'hémisphère controlatéral (Jeffery 1997). Certaines études ont aussi démontré chez le furet albinos que les axones du tractus optique ont des morphologies anormales (Guibal & Baker 2009) et que la représentation du méridien vertical est déplacée médialement au niveau de leur cortex visuel primaire (Akerman et al. 2003).

2.1.2 Souris C57BL/6 énucléée à la naissance

Dans la rétine en formation, des vagues d'activation spontanées se propagent et permettent la mise en place d'une organisation rétinotopique dans presque toutes les structures du système visuel. Il existe trois types de vagues d'activation, qui apparaissent de manière successive pendant le développement pré- et postnatal. Les premières vagues se transmettent entre les cellules des couches cellulaires internes de la rétine par des jonctions communicantes (Syed et al. 2004). Le deuxième type de vagues requiert la relâche d'acétylcholine par les cellules amacrines de la rétine (Bansal et al. 2000; Feller 2004; Feller et al. 1997; Feller et al. 1996; Zhou & Zhao 2000), qui possèdent une arborisation dendritique très étendue. Ces vagues se propagent donc dans un plan horizontal sur l'ensemble de la rétine (Feller et al. 1997; Syed et al. 2004). Les vagues du troisième type, quant à elles, se propagent grâce à la relâche de glutamate par les cellules bipolaires de la rétine (Bansal et al. 2000; Syed et al. 2004; Zhou & Zhao 2000), qui sont organisées dans un plan vertical. Les vagues dépendantes du glutamate ont donc un effet local (Zhou & Zhao 2000), ce qui semble leur procurer un rôle dans le raffinement de la rétinotopie.

La souris C57BL/6 naît après environ 18 jours de gestation. À ce moment, les axones thalamo-corticaux provenant de la portion dorsale du noyau géniculé latéral ont déjà atteint la couche 4 et les couches 2/3 viennent tout juste de se former (Clancy et al. 2001). Les souris destinées à ce groupe seront énucléées dans les 24h suivant la naissance. L'activité intrinsèque de la rétine aura donc déjà participé au développement du système visuel pendant la période embryonnaire, mais aucune expérience visuelle ne pourra finaliser le développement de leurs voies visuelles. De plus, contrairement aux souris anophtalmes, chez qui la portion dorsale du noyau géniculé latéral du thalamus reçoit des afférences auditives en provenance du collicule inférieur, il n'y a pas de recrutement des voies visuelles sous-corticales chez la souris énucléée (Chabot et al. 2007). Chez ces animaux, la circuiterie cortico-corticale pourrait donc être altérée.

2.1.3 Souris ZRDCT/An

La souris ZRDCT/An est un modèle murin d'anophtalmie congénitale. Plus de 90 % des souris ZRDCT/An souffrent de ce déficit visuel qui se traduit par l'absence de globe oculaire, de rétine et de nerf optique (Figure 2.1) (Chase & Chase 1941). Les 10 % restantes souffrent généralement de microphthalmie ou de monophthalmie (Silver et al. 1984).



Figure 2.1 Absence de nerf optique, chiasma optique et tractus optique chez la souris ZRDCT/AN.

À gauche, une vue ventrale du cerveau d'une souris voyante de souche C57BL/6 permet d'observer la position normale des structures visuelles. Les structures pointées par les pointes de flèche sont, du haut vers le bas, le nerf optique, le chiasma optique et le tractus optique. À droite, une vue ventrale du cerveau d'une souris de souche ZRDCT/An permet de démontrer l'absence complète de ces structures chez les animaux souffrant d'anophtalmie congénitale. Rostral en haut. Échelle = 1 cm.

Le développement normal de l'œil commence avec une évagination du prosencéphale, la vésicule optique, qui s'étend vers l'ectoderme. Lors du contact avec l'ectoderme, la vésicule optique se replie sur elle-même de manière à former la cupule optique. La rétine et le nerf optique se développeront ensuite à partir de la paroi de la cupule optique (Larsen 2003). Il a été démontré que le gène à homéobox *Rx/rax* est requis pour le développement de la vésicule optique et qu'il est activé, chez la souris, à partir du jour embryonnaire (E) 7,5 au niveau de la plaque neurale, vers E9,5 dans la vésicule optique et vers E10,5 dans la cupule optique (Furukawa et al. 1997; Mathers et al. 1997; Tucker et al. 2001).

Le phénotype d'anophtalmie observé chez la souris ZRDCT/An apparaît lorsque l'animal est homozygote pour le locus récessif *ey1* (Chase 1942), causé par une mutation du gène à homéobox *Rx/rax* retrouvé sur le chromosome 18 (Tucker et al. 2001). Il s'agit d'une mutation ponctuelle ATG→TTG, au niveau du 10^e codon de l'exon codant pour la protéine Rx (Figure 2.2). Ainsi, au lieu d'une méthionine (ATG), ce codon code pour une leucine (TTG). En situation normale, la traduction de l'ARN messager en protéine Rx est initiée au niveau des codons 1 et 10. Lors d'une mutation M10L, l'initiation de la traduction ne se produit qu'au niveau du codon 1, ce qui entraîne une réduction des niveaux d'expression de la protéine Rx (Tucker et al. 2001). Chez la souris ZRDCT/An, il a été démontré que la diminution d'expression de la protéine Rx empêche la croissance normale de la vésicule optique aux environs du 10^e jour embryonnaire (Chase & Chase 1941).

Des mutations au niveau du gène à homéobox *Rx/Rax* sont aussi responsables de l'anophtalmie congénitale humaine (Lequeux et al. 2008; Verma & Fitzpatrick 2007). La souris ZRDCT/An est donc un modèle intéressant pour étudier le développement des structures visuelles en absence complète d'activité rétinienne, depuis le développement embryonnaire.

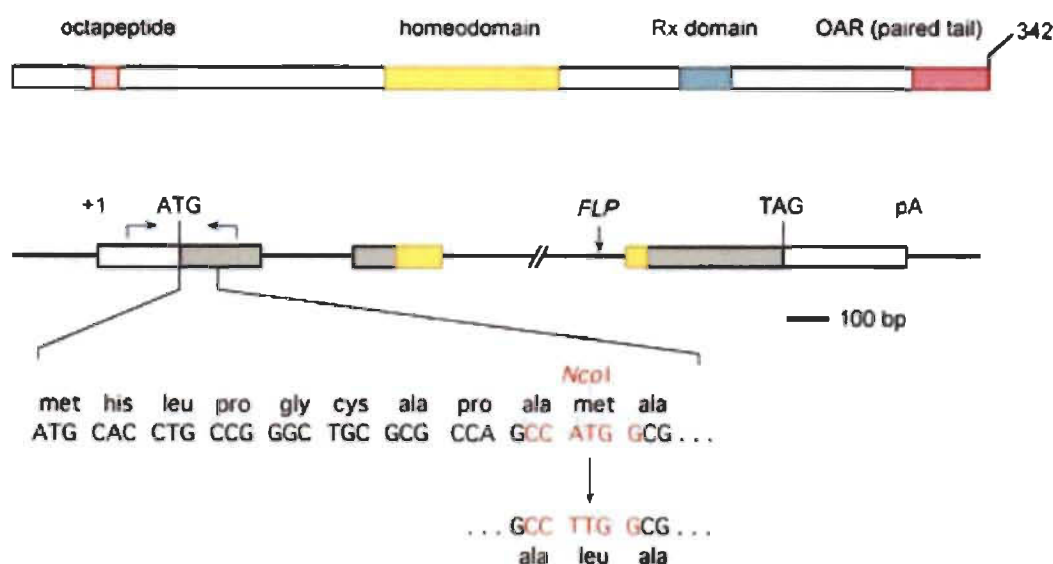


Figure 2.2 Le gène à homéobox Rx/rax et sa mutation chez la souris ZRDCT/AN.

La base adénine (A) est mutée pour une thymine (T) sur le codon en position 10 du gène Rx. Celui-ci code alors pour une leucine au lieu d'une méthionine (M10L) (Tucker et al. 2001).

2.2 Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux

Afin de déterminer l'effet de l'expérience visuelle sur le développement des circuits corticaux, nous comparerons la topographie des projections du cortex visuel primaire vers les aires extrastriées chez des souris voyantes, énucléées et anophtalmes. Puisque les aires extrastriées se développent dans des régions acalleuses bordées par des zones de projection calleuses, et puisque ces dernières sont désorganisées chez les animaux privés d'afférences visuelles, nous injecterons un traceur rétrograde dans l'hémisphère droit (controlatéral), de manière à marquer ces zones de projection calleuses dans l'hémisphère gauche (ipsilatéral). Deux injections de traceur antérograde seront aussi effectuées dans l'hémisphère ipsilatéral de ces mêmes souris, de manière à marquer des axones provenant de régions topographiquement différentes de l'aire visuelle primaire. Ces axones devraient former des colonnes de projection dans chacune des aires extrastriées.

2.2.1 Injection de traceurs antérogrades

Le dextran biotinylé amine 10kDA et la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* seront utilisés. Ces traceurs sont captés par le corps cellulaire des neurones présents au site d'injection et migrent le long des axones jusqu'aux terminaisons axonales. Ils seront utilisés pour marquer les projections du cortex visuel primaire vers les aires extrastriées.

Le dextran biotinylé amine 10kDA est le traceur antérograde le plus souvent utilisé pour les études neuronatomiques. Il est facile à utiliser en ce sens qu'il peut être injecté autant par pression que par iontophorèse et peut être révélé directement par une streptavidine ou un kit avidine-biotine-peroxydase. Ce traceur est intéressant puisqu'il offre un marquage homogène le long des axones et de leurs terminaisons (Lanciego & Wouterlood 2011).

La leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* permet aussi de visualiser les axones et les terminaisons axonales avec une bonne résolution. La détection de ce traceur doit cependant être effectuée par immunohistochimie (Lanciego & Wouterlood 2011).

2.2.2 Injection de traceurs rétrogrades

Les traceurs rétrogrades sont captés par les terminaisons axonales présentes au site d'injection et migrent rétrogradement jusqu'au corps cellulaire, où ils s'accumulent. Ils seront utilisés pour visualiser les bandes de projections calleuses dans l'hémisphère controlatéral. Nous injecterons donc du Fluoro-Gold ou de la bisbenzimidide.

Le Fluoro-Gold et la bisbenzimidide sont deux traceurs fluorescents qui résistent aux procédures d'immunohistochimie et dont la fluorescence est très robuste (Lanciego & Wouterlood 2011). Ces traceurs ne nécessitent pas de réaction d'immunohistochimie pour être observés, ils peuvent être visualisés simplement sous la lumière UV.

2.3 Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels

Le but premier de cette étude est de démontrer l'existence de connexions indirectes entre deux aires sensorielles primaires, à l'échelle cellulaire. Pour y parvenir, il faut donc démontrer qu'il y a effectivement des contacts synaptiques entre les axones auditifs et les dendrites ou les corps cellulaires des neurones de l'aire visuelle secondaire latérale qui projettent vers le cortex visuel. Ceci requiert l'injection d'un traceur neuronal rétrograde qui permet de marquer l'arborisation dendritique complète de neurones de l'aire visuelle secondaire latérale qui projettent vers dans l'aire visuelle primaire. Le traceur qui sera utilisé est un adénovirus de type 5 qui exprime la protéine fluorescente verte amplifiée sous le promoteur de la synapsine (AdSynEGFP). Un traceur antérograde, le dextran amine biotinylé 10kDa, sera injecté dans le cortex auditif primaire. Ceci permettra de marquer les axones auditifs qui se terminent dans le cortex visuel secondaire latéral. La combinaison de ces deux traceurs permettra visualiser les contacts potentiels entre des axones auditifs et les dendrites rétrogradement marqués.

Cette stratégie permettra d'aborder la microstructure des circuits corticaux d'une manière novatrice en cartographiant la distribution des contacts synaptiques d'une connexion sur l'arborisation dendritique complète d'un neurone. Cette arborisation dendritique représente la structure de l'algorithme de l'analyse effectuée par le neurone et elle comprend différents compartiments fonctionnels (Spruston 2008). Cette technique nous permettra de voir la connexion entre le cortex auditif et visuel et de déterminer par lesquels de ces compartiments cellulaires l'information circule.

Puisque le deuxième objectif de cette étude est d'étudier l'effet de l'expérience visuelle sur le développement de ce microcircuit, l'étude sera réalisée chez des souris voyantes et énucléées à la naissance.

2.3.1 L'adénovirus, un marqueur rétrograde

Pour cette étude, un marquage de type Golgi de l'arborisation dendritique et des épines dendritiques sera nécessaire. Peu de traceurs rétrogrades offrent une telle

résolution, car le marquage résultant est généralement limité au corps cellulaire et aux segments dendritiques proximaux (Lanciego & Wouterlood 2011).

Depuis le début des années 2000, des chercheurs ont développé des traceurs viraux qui offrent un marquage neuronal de type Golgi. L'un d'entre eux est l'AdSynEGFP (Tomioka & Rockland 2006). Le promoteur syn I est spécifiquement retrouvé dans les neurones; ils seront donc les seuls à exprimer la protéine fluorescente verte. Pour obtenir un bon niveau de signal, le marquage pourra être amplifié par immunohistochimie, en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine fluorescente verte.

Cet adénovirus a aussi été inactivé par l'élimination des séquences E1 et E3 de son génome, ce qui le rend inapte à la réplication (Tomioka & Rockland 2006). Ainsi, seuls les neurones qui projettent au site d'injection expriment la protéine fluorescente. La délétion des séquences E1 et E3 fait aussi en sorte de limiter son potentiel pathogène.

2.3.2 Microscopie confocale

Dans cette étude, l'hypothèse d'une connexion indirecte entre les cortex primaires auditif et visuel, passant par le cortex visuel secondaire latéral, et l'effet de l'activité rétinienne sur le développement de ce circuit seront étudiés. Le nombre d'afférences auditives sur les neurones du cortex visuel secondaire latéral, rétrogradement marqués par une injection dans le cortex visuel primaire, sera donc comptabilisé chez des souris voyantes et énucléées.

L'analyse requiert donc une résolution suffisamment grande pour valider la présence de contact entre les structures présynaptique et postsynaptique, afin de pouvoir valider la présence d'une synapse. Nous avons choisi d'utiliser la microscopie confocale au laser, puisqu'elle offre à la fois une résolution suffisante pour répondre à ces critères et permet d'obtenir les résultats sur assez de neurones pour comparer les deux groupes expérimentaux.

2.4 Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticales descendantes

Dans la dernière étude présentée dans cette thèse, la morphologie dendritique de neurones pyramidaux de la couche 5 sera utilisée pour étudier les différents types de connexions *feedback*. Nous étudierons plus précisément des connexions *feedback* homomodales, en provenance des aires visuelles secondaires latérales et médiales, et hétéromodales, provenant des aires auditives et somesthésiques primaires, vers le cortex visuel primaire. Ces connexions seront étudiées chez la souris de souche C57BL/6. Cette étude sera rendue possible par l'utilisation du traceur rétrograde AdSynEGFP, offrant un marquage de l'arborisation dendritique complet.

Cette étude mènera à la comptabilisation de 25 paramètres morphologiques sur 63 neurones pyramidaux de la couche 5, provenant de 10 aires corticales différentes (l'aire visuelle secondaire latérale étant divisée en deux régions, voir Chapitre 5). La stratégie d'analyse consistera donc à utiliser des techniques d'ordination dans un espace multidimensionnel afin de déterminer si des groupes morphologiquement distincts peuvent être retrouvés et de déterminer s'ils correspondent à l'une des hypothèses proposées dans la littérature, soit la modalité sensorielle, la hiérarchie corticale ou la latéralité. Nous utiliserons donc les analyses des composantes principales et de groupement.

2.4.1 Analyse des composantes principales

Plusieurs variables, ou descripteurs, peuvent être utilisés pour caractériser chacun des objets d'une population. Lorsqu'un grand nombre de descripteurs sont utilisés, il devient difficile de déterminer lesquels permettent de départager des sous-ensembles d'une population. L'analyse des composantes principales permet de rassembler les descripteurs fortement corrélés en groupes appelés composantes principales. Le nombre maximal de composantes principales pourrait, en théorie, être égal au nombre de descripteurs mesurés, mais il est généralement inférieur (Jolliffe 2002). Puisque ce sont les descripteurs corrélés qui forment chacune des composantes principales, ces dernières

devraient représenter un processus sous-jacent, responsable de l'état des objets étudiés (Tabachnick & Fidell 2007).

L'analyse des composantes principales débute avec la sélection des descripteurs. Ceux-ci sont ensuite mesurés pour chacun des objets à l'étude et les données sont entrées dans une matrice des variables, où les rangées représentent les objets et les colonnes représentent les descripteurs. Ces informations permettent de représenter les objets dans un espace multidimensionnel, dont le nombre de dimensions est équivalent au nombre de descripteurs mesurés (Figure 2.3). Lors de l'analyse des composantes principales, les données sont normalisées et les objets sont représentés dans un espace centré-réduit. Cette procédure est nécessaire dans ce type d'analyse puisqu'elle permet de limiter l'influence qu'aurait l'utilisation d'échelles de mesure différentes entre les descripteurs sur la variance.

Dans l'espace multidimensionnel, le nuage de point adopte habituellement une forme non sphérique, avec certains axes plus allongés que d'autres. Cette déformation est représentative de la variance retrouvée dans la population pour chacun des descripteurs mesurés. À partir du nuage de point, une rotation et une translation des axes de l'espace multidimensionnel sont effectuées, de manière à ce que l'axe principal soit aligné avec la plus grande variance (Figure 2.3b). Cet axe principal constitue la première composante principale. Le second axe est orthogonal à celle-ci et est positionné dans le plan de la deuxième plus grande variance. Ainsi, les composantes principales sont orthogonales les unes par rapport aux autres et la première composante principale explique toujours le maximum de variance (Jolliffe 2002; Legendre & Legendre 1998). Les composantes principales subséquentes expliquent, à leur tour, le maximum de variance à partir de la variance résiduelle. La somme des variances expliquées par toutes les composantes principales totalise toujours 100 %.

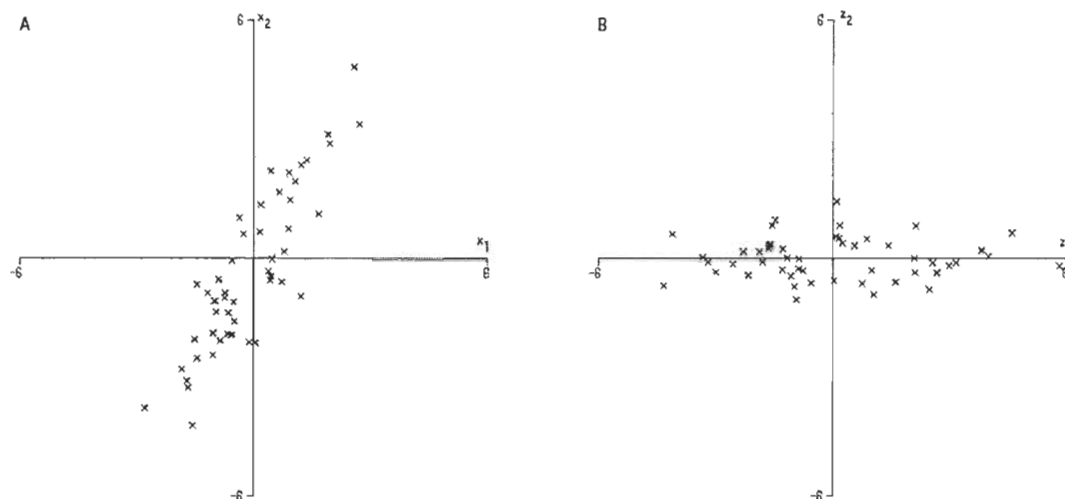


Figure 2.3 Analyse des composantes principales.

L'exemple présente des objets caractérisés par deux variables (x_1 et x_2), ce qui explique la présence de seulement deux dimensions. A) Avant et B) après rotation des axes. La rotation permet d'associer la plus grande variance à la première composante principale. Remarquez que les deux composantes principales (z_1 et z_2) sont orthogonales. Ce principe peut s'appliquer à tout espace comportant n dimensions (Jolliffe 2002).

Lors d'une analyse des composantes principales, le but est d'expliquer le plus de variance avec le plus petit nombre de descripteurs possibles. La prochaine étape consiste donc à déterminer quelles données peuvent être exclues de l'analyse. Pour ce faire, il faut premièrement identifier les composantes principales qui possèdent une grande variance.

Pour y arriver, il faut trouver la valeur des *eigenvectors* (vecteurs unitaires) et des *eigenvalues*. En calcul matriciel, un vecteur change généralement de direction et d'orientation lorsqu'il est multiplié par une matrice, sauf dans le cas de certains vecteurs qui conservent leur orientation; ce sont les *eigenvectors*. Les informations contenues dans la matrice feront cependant en sorte que cet *eigenvector* soit allongé, raccourci, inversé ou inchangé. Le facteur d'étirement ou de contraction de l'*eigenvector* correspond à l'*eigenvalue*, dont la valeur est déterminée par la variance (Figure 2.4). Comme il y a une variance pour chaque composante principale, il y aura aussi un *eigenvector* et une *eigenvalue* pour chacune des composantes principales.

Pour calculer les *eigenvectors* et les *eigenvalues* correspondantes, il faut premièrement multiplier la matrice des variables par sa matrice transposée. Le résultat de ce calcul est la matrice de corrélation des variables. Cette dernière peut aussi être considérée comme étant le produit de trois matrices, soit la matrice des *eigenvectors*, la matrice des *eigenvalues* et la matrice des *eigenvectors* transposée. À partir de cette matrice de corrélation, différentes opérations mathématiques complexes pourront donc être effectuées afin d'obtenir les valeurs des *eigenvectors* et des *eigenvalues* (voir Tabachnick & Fidell 2007 pour une démonstration mathématique).

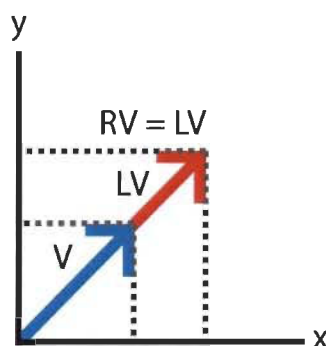


Figure 2.4 Lien entre *eigenvector*, *eigenvalue* et matrice de corrélation des variables.

La variance observée dans la matrice de corrélation des variables (R) force l'étirement de l'*eigenvector* (V). Le coefficient d'étirement correspond à l'*eigenvalue* (L).

Puisque l'alignement des composantes principales et du nuage de points s'est fait de manière à ce que les premières composantes principales aient la plus grande variance, la première composante principale, qui a une grande variance, aura une grande *eigenvalue*. Les composantes principales subséquentes, qui ont variances de plus en plus petites, auront des *eigenvalues* de plus en plus petites. C'est donc à partir de l'*eigenvalue* que la décision de conserver ou d'exclure une composante principale est prise (Legendre & Legendre 1998). Selon la règle de Kaiser-Guttman, seules les composantes principales possédant une *eigenvalue* supérieure ou égale à la valeur moyenne des *eigenvalues* devraient être conservées. Dans l'analyse, les données sont normalisées et la valeur moyenne des *eigenvalues* est égale à 1,000. Ainsi, seules les composantes principales ayant une *eigenvalue* supérieure ou égale à 1,000 seront conservées, puisque c'est au niveau de celles-ci que le maximum de variance de la population est retrouvé.

La prochaine étape de cette analyse consiste à réduire le nombre de descripteurs nécessaire à la discrimination des sous-ensembles d'une population. Pour sélectionner les descripteurs à conserver, il faut déterminer quels descripteurs influencent chacune des composantes principales conservées précédemment. Pour ce faire, les niveaux de corrélation entre chaque descripteur et chaque composante principale sont mesurés. Plus la valeur est élevée, sans tenir compte du sens de la corrélation, plus le descripteur est fortement corrélé à cette composante principale. Ainsi, seuls ceux fortement corrélés ($\geq |0,7|$) à au moins une composante principale sont conservés; les autres sont exclus des analyses subséquentes.

Finalement, le niveau de corrélation de chaque descripteur avec chacune des composantes principales peut être utilisé pour prédire la position de chaque objet dans l'espace multidimensionnel.

2.4.2 Analyse de groupement

L'analyse de groupement est complémentaire à l'analyse des composantes principales. Différentes méthodes et plusieurs algorithmes peuvent être utilisés pour procéder à l'analyse de groupement.

Puisque le but de l'étude était de déterminer si des sous-groupes de neurones pouvaient être retrouvés à l'intérieur de l'ensemble de la population neuronale à l'étude, nous avons utilisé une méthode d'analyse de groupement hiérarchique. Dans ce type de méthode, les groupes se forment de manière à ce que chacune des divisions donne naissance à des groupes composés d'objets qui appartiennent aux groupes précédents (Legendre & Legendre 1998).

Plusieurs algorithmes peuvent être utilisés pour effectuer une analyse de groupement hiérarchique : groupements d'agglomération, groupements à liaison moyenne ou à la moyenne des centroïdes et groupements selon la plus petite variance (Legendre & Legendre 1998).

Les différentes méthodes de groupements d'agglomération forment des groupes sur la base de la position des objets les uns par rapport aux autres dans l'espace multidimensionnel, et donc selon les valeurs attribuées à chacun des descripteurs. Les groupements à liaison moyenne quant à eux prennent en considération la moyenne des similitudes entre les objets ou les centroïdes de chacun des groupes. Le centroïde correspond à la moyenne des objets d'un groupe.

Bien que ces algorithmes auraient aussi pu être sélectionnés dans cette étude, nous utiliserons la méthode de Ward, qui organise les objets dans l'espace de manière à former des groupes ayant la plus petite variance possible (Ward 1963). Cette technique est la plus appropriée pour étudier des objets qui ont au préalable été analysés avec une analyse des composantes principales, qui tient compte de la variance dans la population. De plus, seules les variables qui ont été conservées avec l'analyse des composantes principales seront utilisées.

Avec cet algorithme de groupement, chaque objet est initialement son propre groupe et la distance entre cet objet et son centroïde est nulle, ce qui fait en sorte que la variance de ce groupe est, elle aussi, nulle. Par la suite, des objets sont regroupés et les centroïdes sont déplacés. Pour que deux objets soient groupés, il faut que la somme des distances au carré entre les objets (distance euclidienne) et le centroïde soit minimale.

CHAPITRE III

PRIMARY VISUAL CORTEX PROJECTIONS TO EXTRASTRIATE CORTICES IN ENUCLEATED AND ANOPHTHALMIC MICE

Le contenu de ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui devrait être soumis avant la fin de l'été 2012 à la revue *Journal of Comparative Neurology* :
Laramée, M.E., Bronchti, G. et Boire, D.

Résumé

Des zones de projections calleuses, représentant le méridien vertical, et des zones acalleuses, dans lesquelles plusieurs aires extrastriées se développent, sont retrouvées en périphérie du cortex visuel primaire (V1) de la souris. Les projections striées-extrastriées respectent la représentation visuotopique retrouvée dans V1. Chez les souris aveugles, le patron normal de projections calleuses et striées-extrastriées est désorganisé. L'effet de la perte d'afférences visuelles sur la représentation topographique dans les aires extrastriées n'est pas connu. L'organisation des projections striées-extrastriées en rapport aux zones de projections calleuses est aussi méconnue chez l'animal aveugle. Il a été proposé que la distribution des projections striées-extrastriées et des projections calleuses sont interdépendantes. Une hypothèse alternative propose plutôt que des mécanismes distincts sont impliqués. Dans le but de déterminer l'effet de l'expérience visuelle prénatale et postnatale sur la topographie des projections striées-extrastriées et le patron de distribution des cellules de projection calleuses, deux traceurs antérogrades ont été injectés dans V1, en plus d'effectuer de multiples injections d'un traceur rétrograde dans l'hémisphère controlatéral, chez des souris intactes et énucléées de souche C57BL/6 et chez des souris anophtalmes de souche ZRDCT/An. Des anomalies ont été retrouvées dans la représentation topographique au niveau des aires extrastriées chez les souris énucléées et, de manière plus importante, chez les souris anophtalmes. Chez ces dernières, un plus grand chevauchement a aussi été observé entre les zones de projection striées-extrastriées et calleuses, comparativement à ce qui est normalement retrouvé chez les souris intactes. Ces résultats suggèrent que l'activité sensorielle régule la distribution de ces projections, en plus du développement de la représentation topographique normale dans les aires extrastriées.

Mots-clés : aveugle, connexions calleuses visuelles, parcellation corticale, projections du cortex strié

**Primary visual cortex projections to extrastriate cortices in enucleated
and anophthalmic mice**

Marie-Eve Laramée ¹, Gilles Bronchti ¹ and Denis Boire.^{1, 2}

1. Groupe de Recherche en Neurosciences, Département de Chimie-Biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7
2. École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,
H3T 1P1

Abstract

The periphery of the primary visual cortex (V1) of the mouse is surrounded by several extrastriate areas within distinct callosal zones each surrounded by callosal projection zones, in visuotopic representations of the vertical meridian. Striate-extrastriate projections are topographic and respect the visuotopic representation found in V1. In visually deprived mice, the normal pattern of callosal and striate-extrastriate projections is disrupted. It remains unknown whether visual deprivation affects the topography of V1-extrastriate projections and their relationship with callosal projections. It has been proposed that the distribution to V1-extrastriate and callosal projections are interdependent. Alternatively, their distribution might be regulated by distinct mechanisms. Two anterograde tracers were injected in V1 and multiple retrograde tracer injections were performed in contralateral hemisphere of intact and enucleated C57BL/6 mice and in ZRDCT/An mice to determine the effects of prenatal and postnatal visual experience on the topography of V1-extrastriate and callosal projections. Greater anomalies were found in the topographic representation in extrastriate areas of enucleated than in anophthalmic mice. In enucleated mice, the relationship between V1-extrastriate projections and callosal zones was highly variable. In anophthalmic mice, there was a greater overlap between these projections. These results suggest that the visual activity regulates the distribution of V1-extrastriate and callosal projections, in addition to the development of a normal topographic representation in extrastriate areas.

Keywords: blind, visual callosal connections, cortex parcellation, striate cortex projections

Introduction

The initial parcellation of the cerebral cortex into distinct cortical areas is determined early in development. This initial determination of cortical areas depends upon intrinsic factors within the cortical sheet (Rakic, 1988) and is apparent by the early expression of particular genes (Bishop et al., 2000; Boncinelli et al., 1993; Gulisano et al., 1996; Muzio and Mallamaci, 2003; Simeone et al., 1992a; Simeone et al., 1992b; Yoshida et al., 1997). Further refinement of cortical connectivity and function is acquired progressively under the influence of sensory activity (Crowley and Katz, 1999; Crowley and Katz, 2000; Goodman and Shatz, 1993; Katz and Crowley, 2002; Lopez-Bendito and Molnar, 2003; Sur and Rubenstein, 2005).

The distribution of cortical callosal connections has been studied extensively as a model system for understanding the role of sensory activity in shaping cortical connectivity. Early in development, callosal connections are exuberant and are distributed throughout the primary and extrastriate cortices. This initial widespread tangential distribution is gradually restricted to the border between striate and extrastriate areas along the representation of the vertical meridian (Innocenti, 1978; Innocenti and Caminiti, 1980; Innocenti and Clarke, 1984; Innocenti et al., 1977). This refinement is dependent upon the selective elimination of callosal axon collaterals, as shown in monkeys (Chalupa and Killackey, 1989), cats (Innocenti, 1981; Ivy and Killackey, 1982), rats (Elberger, 1994; Hermit et al., 1996; Lund and Lund, 1970; Miller and Vogt, 1984a; Miller and Vogt, 1984b; Olavarria and Van Sluyters, 1985) and mice (Cusick and Lund, 1981; Olavarria and Montero, 1989; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Rhoades et al., 1984).

Visual deprivation alters the normal adult tangential distribution of callosal neurons (Berman, 1991; Bock and Olavarria, 2011; Boire et al., 1995; Innocenti and Frost, 1979; Innocenti and Frost, 1980; Innocenti et al., 1985; Olavarria, 1995; Olavarria and Van Sluyters, 1995). In enucleated and anophthalmic rats and mice, callosal neurons are not limited to the border between primary and extrastriate cortices (Abel and Olavarria, 1996; Olavarria et al., 1988a; Olavarria et al., 1987; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Olavarria and Li, 1995; Rhoades et al., 1984). This pattern is also more variable in

visually deprived than in normal intact animals. The end result is a disrupted pattern of callosal zones in the occipital cortex of visually deprived animals.

The visual cortex in mice is surrounded by functionally distinct extrastriate areas (Marshel et al., 2011; Olavarria et al., 1982; Schuett et al., 2002; Wagor et al., 1980; Wang and Burkhalter, 2007). Recent evidence shows that these areas form ventral and dorsal streams with similar functional properties as those described in primates (Andermann et al., 2011; Marshel et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012). The location of extrastriate areas in acallosal zones in the periphery of the primary visual cortex, separated by callosal bridges that match the representations of the vertical meridian, appears to be common theme in primates and rodents (Bravo et al., 1990a; Bravo et al., 1990b; Olavarria and Montero, 1984; Olavarria and Montero, 1989; Thomas and Espinoza, 1987; Van Essen et al., 1982; Zeki, 1977; Zeki, 1978; Zeki and Sandeman, 1976).

Previous studies have shown that visual deprivation alters the distribution of striate-extrastriate projections in rats (Bravo and Inzunza, 1994; Laing et al., 2012). Given that the distribution pattern of callosal and striate-extrastriate cortical projections are complementary, it is hypothesized that because visual deprivation greatly alters the tangential distribution of visual callosal connections and alters the location and size of the acallosal areas in the periphery of the primary visual cortex, the correlated tangential organization of the striate-extrastriate visual projections might also be altered. In addition, because afferent sensory activity is an important factor in determining topographical relationship of cortical connections, we propose that early loss of sight could alter the visuotopic topography of striate-extrastriate connections.

In this study, we report on the correspondence between the tangential organization of callosal connections and the projections from the primary visual cortex to the extrastriate cortices in intact and enucleated C57BL/6 mice, as well as in congenitally anophthalmic ZRDCT/An mice.

Methods

Mice

A total of twenty-eight mice were used. Fifteen mice were used to compare the striate-extrastriate projection zone. These were intact C57BL/6 mice (n=5), bilaterally enucleated from birth C57BL/6 mice (n=5) and anophthalmic ZRDCT/An mice (n=5). Five intact mice, four enucleated mice and four anophthalmic mice were used for the simultaneous study of the striate-extrastriate and callosal projection zones. All animals were adults (between 90-180 days) when the cortical tracer injections were performed. All experimental procedures were approved by the UQTR Animal Care Committee and were carried out in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Neonatal enucleations:

C57BL/6 pups were bilaterally enucleated within 24h of birth. They were deeply anesthetized by hypothermia and the palpebral fissure was opened with a scalpel. The optic nerve and artery were sectioned and the eyeballs were extracted. Ocular orbits were filled with Gelfoam (Upjohn) to prevent hemorrhage. At the end of the surgery, pups were warmed and returned to their nest when fully awake.

Injections and tissue processing:

V1-extrastriate projections:

Each mouse received an injection of biotinylated dextran amine (BDA 10kDa, 10%, Invitrogen) at 3.0mm posterior and 2.5mm lateral to bregma. In order for the injection site to cover all cortical layers without involving the underlying white matter three injections at different depths from the pial surface were performed for each single cortical location (5 μ A, 7s on/off duty cycle, 1min at 500 μ m and 100 μ m; 2min at 400, 300 and 200 μ m).

V1-extrastriate projections with respect to callosal projection zones:

In order to label callosal projection neurons in the whole caudal left hemisphere in temporal parietal and occipital cortices, each mouse received multiple 0.1µl injections of Fluoro-Gold (2.5%, Invitrogen) or bisbenzimidazole (5%, Sigma-Aldrich). A large craniotomy was performed over the right hemisphere, between the lambda and bregma sutures and from the midline to the insertion of temporal muscles. Injections were distributed over the exposed cortex in a grid pattern every 500 µm. In the same animal, two anterograde tracer injections were performed in the left hemisphere. Columnar stereotaxic injections of biotinylated dextran amine (BDA 10kDa, 10%, Invitrogen) with the injection parameters described above were performed at 3.0mm posterior and 2.5mm lateral to bregma and *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHAL, 2.5%, Vector Labs) was injected at 3.8mm posterior and 2.7mm lateral to bregma (5µA, 7s on/off duty cycle, 2min à 500µm and 100µm; 4min at 400, 300 and 200µm). After the surgery, animals were returned to their cages for recovery.

Perfusion and tissue processing:

Following a seven days survival period after the tracer injections, mice were anesthetized with ketamine (1.5mg/kg) and xylazine (0.1mg/kg) and perfused with phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer (PB). The brains were harvested, post-fixed in 4% PFA for 1-2 hour and placed overnight in a 30% sucrose solution for cryoprotection.

The brains that received a BDA injection only, were cut in 50µm coronal serial sections on a freezing microtome. Sections were washed in PBS and incubated in a 70% methanol solution containing 0.15% H₂O₂ to quench endogenous peroxidases. They were then rinsed in a 0.05M Tris-HCl-buffered 0.9% saline solution (TBS, pH 8.0) containing 0.5% Triton X-100 (TBS-Tx) before being incubated in an Avidin-Biotin Complex kit (Vector Laboratories) at room temperature. After a few rinses in TBS, anterograde labeling was revealed with nickel-intensified 3-3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) as a chromogen. Specifically, sections were incubated in Tris buffered

(TB) (0.05 M)-nickel ammonium sulfate 0.4% pH 8.0 before being placed in a TB-nickel ammonium solution containing 10% DAB and 0.02% H₂O₂.

The brains that were prepared to study the V1-extrastriate projections with respect to the callosal projections were photographed before being processed for immunohistochemistry. Whole brain fluorescent images of Fluoro-Gold or bisbenzimidazole labeling were acquired under a 1.5X objective with a magnification of 10X on a Zeiss SteREO Discovery.V12 microscope coupled to an AxioCam MRm CCD digital camera.

The brains were then cryoprotected, frozen and cut in 50µm coronal serial sections. Every other section was directly mounted on slides and processed for Nissl staining. The alternate sections were processed for immunohistochemistry. Sections were washed in PBS and then incubated in 5% normal donkey serum (NDS) containing 0.5% Triton X-100 in 0.1M PBS (PBS-Tx) for 2h. After few rinses in PBS-Tx, sections were placed overnight in the primary antibody solution made of rabbit anti-PHAL (2µg/ml, Vector Labs, Cat no. BA-0224) antibody and 2% NDS in PBS-Tx. After rinses in PBS-Tx, sections were incubated in the secondary antibody and streptavidin solution containing 5% NDS and PBS-Tx. Donkey anti-rabbit Alexa-488 conjugated secondary antibody (6.5µg/ml, Jackson Immunoresearch) was used to reveal PHAL and Streptavidin Alexa Fluor 647 (10µg/ml, Invitrogen) was used to label BDA. Sections were then rinsed in 0.01M PB, mounted on slides, dehydrated and coverslipped.

Analysis:

All section contours were traced under an Olympus BX51W1 microscope coupled to a Hamamatsu EM-CCD digital camera both controlled by the Neurolucida software (MicroBrightField, Williston VT). On all sections processed for fluorescence, both injection sites and the distribution of callosal retrograde labeling were charted under a 4X objective (0.16 NA). BDA or PHAL anterograde labeling were also charted under a 10X objective (0.40 NA).

Every other section was processed for Nissl staining and used to delineate the areal borders of V1. The borders of V1 traced from Nissl stained sections we applied to the matched contours of the fluorescent sections. Delineations of V1 were performed according to cytoarchitectonic features, namely a broad and dense layer IV and hypocellular layers Va and Vc (Caviness, 1975).

Three dimensional dorsal projection images were produced with the 3D view tool of the Neurolucida software for BDA, PHAL, callosal zones and V1 delineation independently, and with all of these tracings together to produce a composite image of all these superimposed features. All of these files were imported in Photoshop (Adobe Creative Suite 5) and superimposed while making sure that the 5 images were in perfect register. Individual maps for each of these features were traced and assembled as layers in Photoshop.

To validate our charting method of BDA, PHAL and callosal projection zones, the composite dorsal view images were superimposed to the whole brain image, where callosal retrograde labeling and position of injection sites were visible. This is shown in Figure 1. In all cases, the tracing was consistent with the whole brain image. The composite images of BDA, PHAL and callosal labeling were then imported in Illustrator (Adobe Creative Suite 5), where the contours of the brain, of the borders of V1 and the identifications of extrastriate areas were added.

All extrastriate areas normally receive topographic projections from the complete representation of V1 (Coogan and Burkhalter, 1993; Wang and Burkhalter, 2007). Two anterograde tracers were injected into V1, so that the topographic distribution of both projection zones would allow the identification of the extrastriate areas.

The callosal projection zones were also used for the identification of extrastriate areas lateral to V1. For instance, RL is typically encircled by a callosal ring and there usually is a callosal bridge between RL and AL. Combining the callosal projection zones and the

pattern of V1 projections allowed for the identification of the nine extrastriate areas in most mice.

Quantitative analysis

Because all BDA, PHAL and callosal projection zones and injection sites were traced in Neurolucida, we were able to measure the overlap between V1-extrastriate projections and callosal projection zones. The level of overlap was then compared between intact, enucleated and anophthalmic mice with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney statistic tests with a level of significance set to $P = 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS 16.0 for Windows. A test of homogeneity of variances was also performed in Excel to determine if the overlap between striate-extrastriate projections and callosal projections was more variable in blind mice.

Results

V1-extrastriate projections

Single BDA injections into V1 resulted in anterograde labeling in areas medial and lateral to V1. The distribution of the projections was significantly different between intact, enucleated and anophthalmic cases (Figure 1).

In intact mice, four labeled patches were observed lateral to V1. In the posterior-anterior direction, these correspond to LM, AL, RL and A. The transition from LM to AL is shown in the inset presented in Figure 1. The V1 projection to LM was dense. AL appeared as a more dispersed projection located just medially to the anterior pole of LM. Medial to V1, two projection areas were seen close to the V1 border. These areas correspond to PM and AM. More medially, a sparse projection zone was found, consistent with the location of MM. In enucleated mice, striate-extrastriate projections did not form discrete dense patches. Instead, they appeared as more dispersed projections and did not form clearly distinct projection hotspots. Similarly, in

anophthalmic mice, the V1 projections to each extrastriate area were not distinct but rather formed continuous bands of labeling medial and lateral to V1. However, in blind mice, the relative position and density of labeling allowed for the identification of extrastriate areas.

Anterograde BDA and PHAL labeling

In intact, enucleated and anophthalmic mice, two anterograde tracers were injected in V1. BDA was injected in the most rostral portion of V1, whereas PHAL was injected more caudally. These injections resulted in patches of anterograde labeling in the surrounds of V1. In AL, the BDA axons were always medial to the PHAL projections, whereas it was the other way around in the more caudal aspect of LM (Figure 2). In all animals, the BDA and PHAL injections resulted in columnar projection zones, where axons emerged from the white matter and arborized in all cortical layers, with most branches confined to layer IV.

Callosal projections

For this section and the two subsequent ones, all descriptions refers to Figure 3 for case CT1 and to Figure 4 for all other intact, enucleated and anophthalmic cases.

Fluoro-Gold or bisbenzimidazole injections retrogradely labeled callosal zones similar to those previously described in intact C57BL/6, enucleated C57BL/6 and congenitally anophthalmic ZRDCT/An mice (Cusick and Lund, 1981; Olavarria and Montero, 1989; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Rhoades et al., 1984; Yorke and Caviness, 1975).

In intact mice, callosal neurons were distributed along the lateral border of V1. This band of callosal neurons was flanked laterally by a longitudinally extended acallosal zone, and another callosal band lateral to extrastriate areas. The anterior portion of the acallosal strip was interrupted by a callosal bridge defining an isolated acallosal zone surrounded by a callosal ring. The rest of V1 was mostly free of callosal projecting

neurons. The injection protocol did not consistently label callosal neurons in the most posterior lateral extrastriate areas. As previously described (Cusick and Lund, 1981), the areas medial to V1 exhibit variable callosal labeling. A large acallosal zone was generally observed, penetrated by callosal extensions that reached the medial border of V1 in some cases. The injection protocol did not consistently label callosal neurons in the most posterior medial extrastriate areas.

As previously shown in anophthalmic and enucleated mice, the tangential distribution of callosal neurons was altered (Cusick and Lund, 1981; Olavarria and Montero, 1989; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Rhoades et al., 1984; Yorke and Caviness, 1975). Although previous studies have shown a medial extension into V1 of the callosal band straddling the lateral V1-extrastriate border, this was not apparent in most of our cases. In one case (case EN4), the expansion of this callosal zone was most apparent in the anterior half of V1. The callosal zone was significantly altered in anophthalmic mice. Consistent with previous studies, this band was displaced medially (cases AN1 and AN2). However, in two cases (cases AN3 and AN4), this callosal zone remained narrow and congruent with the V1-extrastriate border. In all anophthalmic mice, a longitudinal band of callosal labeling appeared well within V1. In two cases (AN1 and AN4), this band extended throughout the full length of V1. It was incomplete in the two other cases (AN2 and AN3). In agreement with previous studies, the callosal zone lateral to lateral extrastriate areas was highly variable in most of the enucleated mice. This band was restricted either to the posterior (EN1 and EN4) or to the anterior (EN2) half of the extrastriate areas. This callosal band was similar to that in intact mice in case EN3 only. It was narrower in anophthalmic than in intact mice and extended throughout the full length of the V1 extrastriate border. This longitudinal callosal band was discontinuous in cases AN2 and AN3. The zone between the two callosal bands was not typically acallosal in enucleated and anophthalmic mice, as in intact cases, except in one anophthalmic mouse (AN4). In both enucleated and anophthalmic mice, one or more extensions of nearby callosal zones invaded this area. As in intact mice, callosal zones medial to V1 were variable.

V1-extrastriate projections

As above, the following descriptions pertain to Figure 3 for case CT1 and to Figure 4 for all other intact, enucleated and anophthalmic cases.

Our goal in injecting two anterograde tracers in V1 was to identify distinct extrastriate areas that comprise a complete topographic representation of V1. This was done by superimposing an image of the extrastriate borders of Wang and Burkhalter (2007) on the cortical reconstructions of striate projections and subsequent size adjustments so as to include labeled patches of both colors in each extrastriate area. Using this strategy, most extrastriate areas could be identified. As in Wang and Burkhalter (2007), the terminology of Montero (1993) for extrastriate areas was adopted.

In all cases, both anterograde tracer injections in V1 resulted in distinct projections in lateral and medial extrastriate areas. Our labeling strategy more consistently labeled lateral than medial extrastriate areas. In one enucleated mouse (EN 4), the PHAL injection did not result in significant anterograde transport and axonal labeling.

In intact mice, most injections were located in acallosal regions of V1. However, BDA and PHAL injection sites in CT2 were entirely and partially coextensive with a callosal island respectively. Both injections generally resulted in patches of anterograde labeling in acallosal zones in lateral and medial extrastriate areas. In some cases, our dual labeling strategy failed to label two distinct patches in each area. For instance, in case CT2 (Figure 4), we failed to identify a PHAL labeled patch in AL.

As previously described (Wang and Burkhalter, 2007), we found four distinct lateral extrastriate representation of V1 in intact mice. These projections were grossly within the confines of four acallosal compartments and were separated by more or less complete callosal bridges. These areas were particularly evident in cases CT1 and CT2. A distinct projection, likely corresponding to RL, was surrounded by a characteristic callosal ring in case CT2. However, area RL in cases CT1 and CT4, was not surrounded by a complete callosal ring. In other cases (CT3 and CT5), RL was not surrounded by a

callosal ring but still comprised a topographic projection from V1. Caudal to the callosal ring of RL, three other topographic representations of V1 were observed that could correspond successively to AL, LM and LI. The discontinuity of the V1-extrastriate patches between RL and AL (CT2 and CT3) and the callosal extension (CT1) or bridge (CT2) allowed for the discrimination between these two areas. In four intact cases (CT1-4) projection zones in AL and LM were clearly located in the lateral acallosal zone. Both tracer injections resulted in antero-posteriorly elongated patches of anterograde labeling. In particular, by superimposing the template of extrastriate areas borders over the composite reconstruction of case CT1, AL and LM were identified as two adjacent areas containing mirror image topographic representations of V1. Within LM, a characteristic medio-lateral reversal of the BDA and PHAL projection patches was observed, which was most evident in case CT1 (see also CT3 and CT4). This reversal could indicate the mirrored reversal between upper and lower visual fields at the horizontal meridian, as shown in the published topographic map of V1 and extrastriate areas (Wang and Burkhalter, 2007). In two cases (CT2 and CT4), projection patches lateral to LM were identified as LI. This is also supported by the mirror reversal at the border between LM and LI, where their representations of the peripheral visual field joined. V1 projections to posterior extrastriate areas were identified as P and POR and, in case CT2, these two areas were also organized as mirror images.

In enucleated mice, some injections were completely (BDA in EN1 and EN4) or partially (BDA in EN2 and PHAL in EN3) located within callosal projection zones in V1. Injections in V1 resulted in patches of anterograde labeling in medial and lateral cortices surrounding V1. Even though the lateral extrastriate cortex was not typically confined within two bands of callosal projections, V1-extrastriate projections intermingled with acallosal areas and the irregular strips of callosal projections. Several areas of striate projection clearly overlapped with areas of callosal projections.

The general distribution of patches of anterograde labeling in the lateral extrastriate cortex defined at least four topographic representations of V1. Combining dual anterograde tracer injections and the known relative distribution of extrastriate areas, we

were able to identify RL, AL, LM, LI, P and POR. In all cases, even though a clear callosal ring does not allow for a certain identification of RL, there was a V1 projection in a corresponding location. As in intact mice, longitudinal patches of labeling were found in LM and LI. Contrary to the common oblong projection zones, RL and LM exhibited more irregular contours in EN3. As described in normal cases, distinct patches were found in POR and P in EN3 and EN4.

In anophthalmic mice, the overlap between the injection site and callosal projection zones in V1 was complete in one case (BDA in AN1) and partial in three cases (BDA in AN3, PHAL in AN1 and AN2). Anterograde tracer injections in V1 resulted in projection patches in lateral and medial extrastriate areas. As in enucleated mice, patches of striate cortical projections lateral to V1 were found in altered callosal projection zones.

In three cases (AN2, AN3 and AN4), striate projection zones clearly allowed the identification of the most lateral (A, RL, AL, LM, LI) and posterior extrastriate areas (P and POR).

The callosal pattern and V1-extrastriate projections in case AN4 more closely resembled the normal cases. In particular, a distinct callosal ring was indicative of RL, in which a discrete patch of anterograde BDA labeling was found. In this case, significant striate projection zones were not within the lateral acallosal band as in intact cases, but overlapped with the longitudinal callosal band along the V1-extrastriate border. As was described in intact cases, elongated patches were found in AL and LM of AN2. In this case, there were also irregularly shaped projections in LM and LI.

Topographic representation of V1-extrastriate projections

As above, all descriptions pertain to Figure 3 for case CT1 and to Figure 4 for all other intact, enucleated and anophthalmic cases.

We have shown here that V1-extrastriate projections allow for the identification of extrastriate areas in both models of blind mice. Topographic projections from V1 to extrastriate areas have been extensively described in C57BL/6 mice (Wang and Burkhalter, 2007). By injecting two different tracers in distant antero-posterior locations in V1, we wished to shed light on the possible alterations of topographic relationships between V1 and extrastriate cortex. In doing this, we aimed at showing the role of sensory activity in determining this topography.

The more anterior (BDA) injection sites in V1 were expected to label more importantly areas of lower field representation, whereas more posterior (PHAL) injection sites, projections terminating in upper visual field representation areas.

For example, the BDA injection in case CT1 labeled the more medial aspect of RL, AL, and of the more rostral portion of LM where the lower visual field representation is found, whereas the PHAL injection labeled the more lateral tier of these areas, where the upper visual field is projected. However, in CT1, we also found BDA labeling in the caudo-lateral aspect of LI. This location should comprise a topographic representation of the upper binocular visual field. Considering this general labeling pattern in extrastriate areas, we estimate that the BDA injection site in V1 straddled the representation of the horizontal meridian and mostly involved portions of the upper visual field representation. If this is the case, we would have expected to find a BDA projection zone in the more medial aspect of caudal LM. The large BDA projection in the rostro-medial aspect of LM that represents for the most part the upper visual field, might extend beyond the horizontal meridian within the representation of the upper visual field. The exact location of the horizontal meridian has not been charted.

Following the PHAL injection in V1 of case CT1, we found PHAL labeling all along the LI/LM border, where the representation of the upper visual field is found. This labeling zone extended in the more rostral aspect of LI/LM, indicating that the injection site straddled the representation of the horizontal meridian in V1.

In agreement with this gross organization of our injection sites in CT1, the BDA labeling was found in the most medial portions of AM and PM and the more lateral portions of P and POR, where the representation of the lower visual field is found. Similarly, the PHAL injection labeled the lateral aspect of AM and PM and the more medial aspect of P and POR, where the representation of the upper visual field is found. The crossing of projections zones over the borders of RL and AL and AL and LM is in agreement with the topographic map showing that these areas are in fact organized as adjacent mirror images.

In CT2, both injections were quite rostral in V1 and most likely located both in the representation of the lower visual field. The more rostral BDA injection resulted in labeling in the rostro-medial portion of RL, in the caudo-lateral of AL, in the more rostral portion of LM/LI, in the caudo-lateral part of P and POR and in the most medial portion of AM and PM.

In other intact cases, the distribution of V1-extrastriate projections were in general agreement with the known visuotopic representation (Wang and Burkhalter, 2007).

We will describe here only the projections for which this relationship did not appear obvious. In case CT3, V1-extrastriate projections formed longitudinal bands in the lateral extrastriate areas RL, AL, LM and LI. The more rostral BDA injection however was peculiar in producing a wide labeled zone in the most lateral portion of LI, where both the upper and lower binocular visual field representations are found. BDA labeling in the rostro-lateral portion of LI and in the rostro-medial portion of LM and medial part of AL was consistent with an injection within the lower binocular visual field representation in V1. This injection also extended in the upper portion in the binocular visual field representation in V1, as suggested by the labeling in the most caudo-lateral aspect of LI, and the rostro-lateral portion of RL and AL. A very similar pattern of V1-extrastriate projections was found in CT4. In case CT5, the rostro-caudal alignment of the BDA and PHAL projections in LI and LM indicates that the injection sites were situated in V1 at representations of different elevations along a similar azimuth. The

more rostral location of BDA projection indicates a higher elevation for this injection site. This corresponds to what is found in AL and RL. Topographic representations in AM and PM do not correspond to those expected. In CT3 and CT5, the PHAL labeling was found in areas corresponding to both the upper and lower visual field representation in AM and PM. In these extrastriate areas, the rostral injection in V1 should result in labeling lateral to the labeling produced by the caudal injection. In CT3 and CT5, the lateral border of AM and PM was therefore drawn to exclude the band of BDA labeling medial to the PHAL projections. With this strategy, no BDA labeling was found in AM and PM in cases CT3 and CT5. In CT4, abnormal BDA and PHAL labeling was found in an area corresponding to the upper and the lower visual field, respectively.

Even though there are no eyes and evidently no visual field in blind mice, we will describe the topographical relationships using visuotopic references to facilitate comparison with intact cases. In blind mice, several anomalous topographic projections between V1 and extrastriate areas were found. The detection of these anomalies was dependent upon the procedure that was used to identify each extrastriate area. These were identified using several criteria. Firstly, a standard map of extrastriate areas was projected over the composite reconstructions of the cortex and each injection site was expected to produce projections in the appropriate quadrants of each extrastriate area. Secondly, each extrastriate area, which is known to contain a complete topographic representation of V1, was expected to contain a projection from both injection sites. Moreover, the callosal projection pattern, although altered in blind mice, maintains some characteristic features that can also be useful for the gross localization of individual areas. The drawings of these standard maps were modified in each case to meet these conditions. This approach allowed us to detect anomalies in 1) the topography of each individual projection considering the normal visuotopic layout of extrastriate areas, 2) the expected position of the two projection zones with regards to the intact cases and the known topography of the V1-extrastriate projection and 3) the number of projections zones within a single area.

The visuotopic topography of the V1-extrastriate projections was abnormal in enucleated cases. More specifically, the BDA injections, located more rostrally in V1, in the representation of the lower visual field, resulted in projections that extended far caudally in LM and LI, in areas that should be dedicated to the upper visual field representation. Similarly, in EN2, the BDA injection labeled very lateral projections in RL and A in the presumed representation of the upper visual field. The PHAL injection, located caudally, in the upper visual field representation in V1, resulted in anterograde labeling in rostral LM in EN2 and EN3 and in rostral LI in EN3, in the presumed representations of the lower visual field. In EN3, the PHAL irregular projections extended in all quadrants of AL and medially in RL in the presumed lower visual field representation. The PHAL injection in EN2 resulted in appropriate projections to the caudo-lateral portion of RL. However, this injection produced a caudo-medial projection in AL in an inappropriate position. We could have traced the border between RL and AL across the RL projection and consequently obtaining an appropriate mirrored projection pattern between RL and AL. In doing this, however, we would have obtained a dual PHAL projection within AL, with at least one projection in an inappropriate position. This solution was not considered the most parsimonious parcellation of this area. Similarly, we could have traced the border between AL and LM more rostrally, excluding this inappropriate PHAL projection from AL, but this would have resulted in very small and distorted RL and AL areas and a very elongated LM.

In anophthalmic mice, alterations of the topographic relationship of V1-extrastriate projections are greater than in enucleated mice and they were not consistent between cases. As in enucleated mice, the BDA injections in anophthalmic mice inappropriately labeled very caudal portions of LM. In AN1, there was a clear callosal ring lateral to V1. The caudal limb of this ring formed a callosal bridge rostral to an elongated acallosal zone that overlapped with the lateral V1 border. This callosal pattern was quite similar to normal cases, in which the callosal ring is indicative of the presence of RL. For this case, the general layout of extrastriate cortices was drawn by superimposing the delineations as they were described by Wang and Burkhalter (2007) and by resizing areas so that the border of RL coincided with the callosal ring. In doing this, clear striate projections were

identified in reduced LM and LI that are located, as in normal cases, within the acallosal zone lateral to V1. Although the BDA labeling in the caudal portion of these areas did not correspond to the expected topographic distribution, the more anterior labeling in LM, LI and also in the caudo-lateral AL were in agreement with the normal topographical representation of the lower periphery of the visuotopic map. In addition, the PHAL projections resulted in two projection zones, one appropriately located in caudal LM and another mislocated projection in rostral LM. In an alternate scenario, if extrastriate delineations were not resized, the callosal ring would likely correspond to the position of AL. This would still result in abnormal projections in LM and the large BDA projection anterior to V1 would completely occupy area A. Whatever scheme was chosen here for defining a possible and parsimonious layout of extrastriate areas, the topography was clearly not normal.

Case AN2 comprised the most numerous anomalies. The PHAL injection labeled appropriate projections in caudal LM, but also labeled the rostral half of LM and the caudal aspect of AL. In addition to the topographic anomalies already described in LM, the BDA injection resulted in multiple projections within individual extrastriate areas (LM, AL and RL).

In case AN3, the V1 projections to lateral extrastriate areas were quite normal. Although the PHAL injection labeled the more anterior border between LM and LI, this could be explained by the location of the injection site close to the center of V1, where a presumed representation of the horizontal meridian would be located.

As mentioned earlier, the callosal pattern in case AN4 is particularly normal. As in AN1, the layout of extrastriate areas was adjusted so that RL is coincident with the callosal ring. The large size of the PHAL injection in V1 could explain the projections in rostral and caudal LM, but the projection in LM should, in this case, be one large patch spanning over the entire length of LM. However, two separate projections were found here. Because the PHAL injection was more caudal than the BDA injection, the PHAL injection should be located lateral to the BDA projection zone in RL. This pattern was inverted here. The adjacent projection zone of BDA in area A and PHAL in RL further

demonstrates the absence of a mirror image for these two areas. In this case, the topographic projection of the BDA injection was in an appropriate position along the V1/A border.

V1-extrastriate and callosal projections overlap

Because V1 neurons in callosal zones project to callosal extrastriate areas (Olavarria and Montero, 1984) and because both the callosal and the V1-extrastriate projections were altered by visual deprivation, we quantified the area of overlap between V1-extrastriate and callosal projections.

The area of overlap between extrastriate projections for each injection site and callosal projection zones are given in Table 1 and are shown in Figure 5. In our intact cases, only one injection site partially overlapped with callosal projection zone (PHAL in CT2, Figure 4). The mean callosal overlap in intact cases was 9.98% for the anterior BDA injection and 11.4% for the posterior PHAL injection. The greatest overlap was not found for PHAL injection in CT2, but for PHAL injection in CT5.

When anterior and posterior injection sites were pooled, there was a highly significant difference in the overlap of V1-extrastriate and callosal projections between the experimental groups (Kruskall-Wallis, $P = 0.009$). This overlap was greater in anophthalmic than in intact mice (Mann-Whitney, $P = 0.001$) and not significantly different between enucleated and intact mice (Mann-Whitney, $P = 0.173$). Within each group, there were no significant differences in callosal overlap between the anterior BDA and posterior PHAL injection (Mann-Whitney, Intact: $P = 0.841$, Enucleated: $P = 0.886$ and Anophthalmic: $P = 0.057$). There was a greater variation in the area of overlap in enucleated mice compared to in intact mice (Intact vs Enucleated: $P = 0.024$; Intact vs Anophthalmic: $P = 0.974$; Enucleated vs Anophthalmic: $P = 0.045$).

Discussion

Technical issues

Callosal projections

Multiple injections in the posterior cerebral cortex showed distributions of callosal neurons similar to those previously documented for intact C57BL/6, enucleated C57BL/6 and anophthalmic ZRDCT/An mice (Cusick and Lund, 1981; Olavarria and Montero, 1989; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Rhoades et al., 1984; Yorke and Caviness, 1975). Whether these injections revealed the whole complement of callosal projections is difficult to assess. Injections did not cover the most caudal and medial aspects of the posterior cerebral cortex. These areas were avoided in order to prevent damage to venous sinuses. Consequently, callosal projections in the corresponding contralateral areas of the occipital cortex might not be completely labeled. It is also difficult to assess how far rostral the complete labeling of callosal projections might extend. Nevertheless, this will not alter our main conclusions. Because the distribution of callosal neurons in the lateral aspect of the primary visual cortex in all three experimental groups is comparable to the expected pattern, the relationship between V1-extrastriate projections with callosal projections is most likely correct.

In our experiments however, the callosal projections might be slightly underestimated. The lateral extrastriate acallosal area was generally free of callosal bridges in our material. These bridges separating areas AL and LM and more caudally between LM and PL have been clearly demonstrated in rats (Olavarria and Montero, 1984), but have not been consistently shown in mice (Olavarria and Montero, 1989; Olavarria et al., 1988b; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Yorke and Caviness, 1975). It has been suggested that these bridges could be difficult to detect in mice due to the small brain size and with less sensitive histochemical techniques (Olavarria and Montero, 1989). We used Fluoro-Gold and bisbenzimidazole for tracing callosal projections. These retrograde tracers might not be as sensitive as HRP-conjugated lectins, and could fail to show these callosal bridges. This would affect the estimated overlap between striate projections and

callosal projections in lateral extrastriate areas. However, because all estimates would be similarly biased, the comparison between experimental groups would remain valid. Our goal here was not to provide an absolute estimate of this overlap but to compare experimental groups. In addition, some cases were injected with Fluoro-Gold and others with bisbenzimidazole. Both these tracers appear to be comparable. We found no significant differences in the overlap of striate and callosal projections in intact, enucleated and anophthalmic mice between these two tracers (Mann-Whitney, $p = 0.762$, 0.486 and 1.0 respectively).

Labeling of V1-extrastriate projections and cortical reconstructions

Dorsal view composite images were obtained from dorsal views of solid model reconstructions obtained from series of coronal sections. This strategy allowed for the validation of injection sites, to ensure that they were restricted to the cortex and did not encroach upon the subcortical white matter. It also allowed for the visualization of all cortical layers, which was useful to assess the combined radial distribution of V1-extrastriate projections and callosal projections in supragranular layers, where the effect of visual deprivation is manifest (Frost et al., 1990; Innocenti et al., 1985). Most studies show the distribution of striate-extrastriate projections on sections of flat-mounted cortices (Laing et al., 2012; Olavarria and Montero, 1981; Olavarria and Montero, 1984; Olavarria and Montero, 1989; Wang and Burkhalter, 2007; Wang et al., 2011; Wang et al., 2012). These are advantageous in showing the relative density of labeling in each area in one section. It is more difficult however to evaluate callosal projection modifications on flat mounted cortices. Indeed, visual impairment alters the distribution of callosal cells located in supragranular layers and has little effects on the tangential distribution of callosal neurons in infragranular layer (Frost et al., 1990; Innocenti et al., 1985). It is quite difficult to distinguish layers on sections of flat-mounts.

Very few studies have shown the combined labeling of striate and callosal projections in rodents (Coogan and Burkhalter, 1993; Laing et al., 2012; Wang and Burkhalter, 2007). Only one study has shown these two projections simultaneously in visually deprived

animals (Laing et al., 2012). Here also, most of these patterns were drawn from flat mounted cortices. In the study by Coogan and Burkhalter (1993), several analyses were performed, as we have done here, from reconstructions of coronal sections, and the patterns obtained are quite comparable to the ones in the present study.

Effect of visual deprivation on the tangential and radial distribution of striate-extrastriate projections

Single BDA injections in V1 showed a tangential expansion of the V1-extrastriate projection patches in both enucleated and anophthalmic cases. This abnormal spreading was greater in the latter. Other studies have shown alterations of the striate-extrastriate projections with single injection into V1 in visually deprived rats (Bravo and Inzunza, 1994; Laing et al., 2012). These studies also demonstrated that early visual deprivation resulted in significant alterations of the V1-extrastriate projections. Ablation of the lateral geniculate nucleus in newborn kittens also results in larger areas of extrastriate cortex occupied by the striate projections (Caric and Price, 1999). Similarly, some studies have shown that visual cortex afferents are more widespread in early enucleated animals (Karlen et al., 2006) and following early thalamic ablations (Kingsbury et al., 2002). However, other studies have not shown such expanded visual afferents in visually deprived mice (Charbonneau et al., 2012; Larsen et al., 2009).

The V1-extrastriate axons terminated densely within layer IV, but extended towards supragranular and infragranular layers. This is consistent with the feedforward striate-extrastriate projection pattern previously described (Coogan and Burkhalter, 1993). Such as in rats enucleated at birth (Laing et al., 2012), the laminar distribution was not altered by neonatal enucleation or anophthalmia. These results suggest that visual experience is required to define the normal tangential spreading of striate-extrastriate projections, but not their radial distribution.

Striate extrastriate projections and callosal connections

V1-extrastriate projections are altered in both groups of blind mice. These modifications are quite comparable to those reported in enucleated (Bravo and Inzunza, 1994; Laing et al., 2012) and anophthalmic (Bravo and Inzunza, 1994) rats and support the hypothesis that retinal afferents are necessary for the normal development of striate-extrastriate projections. As in rats, the striate projections in mice were more altered in the anophthalmic than in enucleated animals (Bravo and Inzunza, 1994). These differences could result from a more precocial visual deprivation in anophthalmic animals compared to animals enucleated at birth or to differences in strains.

The mice we used are of different strains: intact and enucleated mice are of the C57BL/6 strain, whereas anophthalmic mice are of the ZRDCT/An lineage. In their study on rats, Bravo and Inzunza (1994) used intact and enucleated albino Sprague-Dawley rats and anophthalmic KV rats. The mutation and causes for the absence of eyes in these rats has not been documented, so whether the altered projections in the anophthalmic mice and rats originate from a common intrinsic factor is not known. Nevertheless, our results in anophthalmic mice are consistent with those from anophthalmic rats. Because they were also shown in two different species, we believe that the greater anomalies found in anophthalmic animals compared to enucleated ones is the result of anophthalmia and not of strains differences. However, we cannot rule out the possibility that interactions between anophthalmia and strain could also be involved.

Similarly, the tangential distribution of callosal connection is also altered in enucleated and anophthalmic mice. One study reports that callosal connections are less disrupted in enucleated than in anophthalmic mice, supporting the role of the eyes in shaping cortical connections even before birth (Rhoades et al., 1984). Conversely, others consider that there are no significant differences in the distribution of callosal connections between enucleated and anophthalmic mice (Olavarria and Van Sluyters, 1984) and rats (Olavarria et al., 1988a) supporting that the eyes begin to influence the development of cortical connections only after birth. These contradictory conclusions can be reconciled however. Both did not concentrate on the same aspects of the callosal distribution. In

light also of the present results, the distribution of callosal connections in both groups of blind mice are disrupted in several ways; callosal bridges appearing in the lateral acallosal zone in enucleated mice and multiples callosal band within the striate cortex in anophthalmic mice. All these studies clearly show that some features of callosal connections develop independently of visual sensory experience and that some feature are disrupted by the absence of sensory experience.

Topography of striate-extrastriate projections

The present study extends previous findings on the striate-extrastriate projections by showing that the topography of these projections is also altered in both enucleated and anophthalmic mice. The topographic anomalies are mostly projections in inappropriate visuotopic locations and projections extending into larger than appropriate territories. We also found evidence for multiple representations of at least portions of V1 in some extrastriate areas. Also, these topographic anomalies were more important in anophthalmic than in enucleated mice. This is the only study reporting on the topography of striate-extrastriate projections in blind animals.

As previously suggested, sensory afferents appear to play a significant instructive role in the development of horizontal cortical connectivity (Kingsbury et al., 2002). This is indeed also shown in cross-modal rewired animals in which visual information is routed to the auditory cortex (von Melchner et al., 2000). In these animals, both callosal and horizontal connections in the auditory cortex adopt a well-organized but different tangential pattern (Gao and Pallas, 1999; Pallas et al., 1999). In the absence of the instructive role of visual afferents, topographical projections of the visual cortex are clearly altered and disorganized.

Sensory experience is also an important factor involved in the pruning of exuberant connections (Luo and O'Leary, 2005). Here, mice either lack visual experience from birth or are congenitally blind. This could account for the less precise striate-extrastriate topography in these animals compared to intact cases.

Link between callosal and striate-extrastriate projections

As in previous studies (Abel and Olavarria, 1996; Berman, 1991; Boire et al., 1995; Bravo and Inzunza, 1994; Innocenti and Frost, 1979; 1980; Innocenti et al., 1985; Laing et al., 2012; Olavarria et al., 1988a; 1987; 1988b; Olavarria and Van Sluyters, 1984; Olavarria, 1995; Olavarria and Li, 1995; Olavarria and Van Sluyters, 1995; Rhoades et al., 1984), we showed that the tangential distribution of both striate-extrastriate projections and callosal connections is altered in blind animals. Whether the development of these corticocortical connections is under the control of a common mechanism is not known. To assess this link, the area of overlap between V1-extrastriate projections and callosal projections, which are normally located in complementary compartments of extrastriate areas (Olavarria and Montero, 1984), was measured and compared in intact, enucleated and anophthalmic mice. A significantly higher percentage of overlap between striate-extrastriate and callosal projections zones was found in anophthalmic mice. Furthermore, the overlap was more variable in enucleated than in intact and anophthalmic cases. These results suggest that postnatal visual activity is required to develop a normal complementary distribution of V1-extrastriate and callosal connections. As discussed above, prenatal visual activity appears to be required, but it cannot be excluded that the observed differences might be due to strain differences.

In neonatally enucleated rats, there is also some overlap between striate-extrastriate projections and callosal areas (Laing et al., 2012). However, the authors did not quantify and compare the percentage of overlap in enucleated rats with the one found in intact rats. It is therefore difficult to conclude if the effect of visual experience found in mice is consistent with other species.

It was suggested that striate-extrastriate projections and callosal connections are regulated by a common mechanism or that independent mechanisms could regulate the development of these two distributions. Here, we found that sensory activity is required for the development of normal topographic representation in extrastriate areas. We also showed that visual experience is needed to develop a normal complementary distribution

between V1-extrastriate and callosal connections. These results are therefore consistent with the former hypothesis and suggest that visual inputs regulate the normal development of these corticocortical connections.

Acknowledgements

Many thanks to Stéphanie Ross for her technical assistance during surgeries. Authors are grateful to Kathleen Rockland for revision of an earlier version of this manuscript.

National Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada grants to D.B. and G.B. and by a Canadian Foundation for Innovation grant to D.B. M.E.L. is supported by an Alexander Graham Bell (NSERC) fellowship.

References

- Abel PL, Olavarria JF. 1996. The callosal pattern in striate cortex is more patchy in monocularly enucleated albino than pigmented rats. *Neurosci Lett* 204(3):169-72.
- Andermann ML, Kerlin AM, Roumis DK, Glickfeld LL, Reid RC. 2011. Functional specialization of mouse higher visual cortical areas. *Neuron* 72(6):1025-39.
- Berman NE. 1991. Alterations of visual cortical connections in cats following early removal of retinal input. *Brain Res Dev Brain Res* 63(1-2):163-80.
- Bishop KM, Goudreau G, O'Leary DD. 2000. Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288(5464):344-9.
- Bock AS, Olavarria JF. 2011. Neonatal enucleation during a critical period reduces the precision of cortico-cortical projections in visual cortex. *Neurosci Lett* 501(3):152-6.
- Boire D, Morris R, Ptito M, Lepore F, Frost DO. 1995. Effects of neonatal splitting of the optic chiasm on the development of feline visual callosal connections. *Exp Brain Res* 104(2):275-86.
- Boncinelli E, Gulisano M, Broccoli V. 1993. *Emx* and *Otx* homeobox genes in the developing mouse brain. *J Neurobiol* 24(10):1356-66.
- Bravo H, Inzunza O. 1994. Effect of pre- and postnatal retinal deprivation on the striate-peristriate cortical connections in the rat. *Biol Res* 27(1):73-7.
- Bravo H, Olavarria J, Martinich S. 1990a. Patterns of interhemispheric and striate-peristriate connections in visual cortex of the South American marsupial *Marmosa elegans* (mouse opossum). *Anat Embryol (Berl)* 182(6):583-9.
- Bravo H, Olavarria J, Torrealba F. 1990b. Comparative study of visual inter and intrahemispheric cortico-cortical connections in five native Chilean rodents. *Anat Embryol (Berl)* 181(1):67-73.
- Caric D, Price DJ. 1999. Evidence that the lateral geniculate nucleus regulates the normal development of visual corticocortical projections in the cat. *Exp Neurol* 156(2):353-62.
- Caviness VS. 1975. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol* 164(2):247-63.

- Chalupa LM, Killackey HP. 1989. Process elimination underlies ontogenetic change in the distribution of callosal projection neurons in the postcentral gyrus of the fetal rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(3):1076-9.
- Charbonneau V, Laramée ME, Boucher V, Bronchti G, Boire D. 2012. Cortical and subcortical projections to primary visual cortex in anophthalmic, enucleated and sighted mice. *Eur J Neurosci* Accepted for publication.
- Coogan TA, Burkhalter A. 1993. Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J Neurosci* 13(9):3749-72.
- Crowley JC, Katz LC. 1999. Development of ocular dominance columns in the absence of retinal input. *Nat Neurosci* 2(12):1125-30.
- Crowley JC, Katz LC. 2000. Early development of ocular dominance columns. *Science* 290(5495):1321-4.
- Cusick CG, Lund RD. 1981. The distribution of the callosal projection to the occipital visual cortex in rats and mice. *Brain Res* 214(2):239-59.
- Elberger AJ. 1994. Transitory corpus callosum axons projecting throughout developing rat visual cortex revealed by Dil. *Cereb Cortex* 4(3):279-99.
- Frost DO, Moy YP, Smith DC. 1990. Effects of alternating monocular occlusion on the development of visual callosal connections. *Exp Brain Res* 83(1):200-9.
- Gao WJ, Pallas SL. 1999. Cross-modal reorganization of horizontal connectivity in auditory cortex without altering thalamocortical projections. *J Neurosci* 19(18):7940-50.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 Suppl:77-98.
- Gulisano M, Broccoli V, Pardini C, Boncinelli E. 1996. *Emx1* and *Emx2* show different patterns of expression during proliferation and differentiation of the developing cerebral cortex in the mouse. *Eur J Neurosci* 8(5):1037-50.
- Hernit CS, Murphy KM, Van Sluyters RC. 1996. Development of the visual callosal cell distribution in the rat: mature features are present at birth. *Vis Neurosci* 13(5):923-43.
- Innocenti GM. 1978. Postnatal development of interhemispheric connections of the cat visual cortex. *Arch Ital Biol* 116(3-4):463-70.

Innocenti GM. 1981. Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science* 212(4496):824-7.

Innocenti GM, Caminiti R. 1980. Postnatal shaping of callosal connections from sensory areas. *Exp Brain Res* 38(4):381-94.

Innocenti GM, Clarke S. 1984. The organization of immature callosal connections. *J Comp Neurol* 230(2):287-309.

Innocenti GM, Fiore L, Caminiti R. 1977. Exuberant projection into the corpus callosum from the visual cortex of newborn cats. *Neurosci Lett* 4(5):237-42.

Innocenti GM, Frost DO. 1979. Effects of visual experience on the maturation of the efferent system to the corpus callosum. *Nature* 280(5719):231-4.

Innocenti GM, Frost DO. 1980. The postnatal development of visual callosal connections in the absence of visual experience or of the eyes. *Exp Brain Res* 39(4):365-75.

Innocenti GM, Frost DO, Illes J. 1985. Maturation of visual callosal connections in visually deprived kittens: a challenging critical period. *J Neurosci* 5(2):255-67.

Ivy GO, Killackey HP. 1982. Ontogenetic changes in the projections of neocortical neurons. *J Neurosci* 2(6):735-43.

Karlen SJ, Kahn DM, Krubitzer L. 2006. Early blindness results in abnormal corticocortical and thalamocortical connections. *Neuroscience* 142(3):843-58.

Katz LC, Crowley JC. 2002. Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* 3(1):34-42.

Kingsbury MA, Lettman NA, Finlay BL. 2002. Reduction of early thalamic input alters adult corticocortical connectivity. *Brain Res Dev Brain Res* 138(1):35-43.

Laing RJ, Bock AS, Lasiene J, Olavarria JF. 2012. Role of retinal input on the development of striate-extrastriate patterns of connections in the rat. *J Comp Neurol*.

Larsen DD, Luu JD, Burns ME, Krubitzer L. 2009. What are the Effects of Severe Visual Impairment on the Cortical Organization and Connectivity of Primary Visual Cortex? *Front Neuroanat* 3:30.

Lopez-Bendito G, Molnar Z. 2003. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4(4):276-89.

Lund JS, Lund RD. 1970. The termination of callosal fibers in the paraviscal cortex of the rat. *Brain Res* 17(1):25-45.

Luo L, O'Leary DD. 2005. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 28:127-56.

Marshall JH, Garrett ME, Nauhaus I, Callaway EM. 2011. Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron* 72(6):1040-54.

Miller MW, Vogt BA. 1984a. Heterotopic and homotopic callosal connections in rat visual cortex. *Brain Res* 297(1):75-89.

Miller MW, Vogt BA. 1984b. The postnatal growth of the callosal connections of primary and secondary visual cortex in the rat. *Brain Res* 316(2):304-9.

Muzio L, Mallamaci A. 2003. *Emx1*, *emx2* and *pax6* in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 13(6):641-7.

Olavarria J, Bravo H, Ruiz G. 1988a. The pattern of callosal connections in posterior neocortex of congenitally anophthalmic rats. *Anat Embryol (Berl)* 178(2):155-9.

Olavarria J, Malach R, Van Sluyters RC. 1987. Development of visual callosal connections in neonatally enucleated rats. *J Comp Neurol* 260(3):321-48.

Olavarria J, Mignano LR, Van Sluyters RC. 1982. Pattern of extrastriate visual areas connecting reciprocally with striate cortex in the mouse. *Exp Neurol* 78(3):775-9.

Olavarria J, Montero VM. 1981. Reciprocal connections between the striate cortex and extrastriate cortical visual areas in the rat. *Brain Res* 217(2):358-63.

Olavarria J, Montero VM. 1984. Relation of callosal and striate-extrastriate cortical connections in the rat: morphological definition of extrastriate visual areas. *Exp Brain Res* 54(2):240-52.

Olavarria J, Montero VM. 1989. Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections. *Vis Neurosci* 3(1):59-69.

Olavarria J, Serra-Oller MM, Yee KT, Van Sluyters RC. 1988b. Topography of interhemispheric connections in neocortex of mice with congenital deficiencies of the callosal commissure. *J Comp Neurol* 270(4):575-90.

Olavarria J, Van Sluyters RC. 1984. Callosal connections of the posterior neocortex in normal-eyed, congenitally anophthalmic, and neonatally enucleated mice. *J Comp Neurol* 230(2):249-68.

Olavarria J, Van Sluyters RC. 1985. Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol* 239(1):1-26.

Olavarria JF. 1995. The effect of visual deprivation on the number of callosal cells in the cat is less pronounced in extrastriate cortex than in the 17/18 border region. *Neurosci Lett* 195(3):147-50.

Olavarria JF, Li CP. 1995. Effects of neonatal enucleation on the organization of callosal linkages in striate cortex of the rat. *J Comp Neurol* 361(1):138-51.

Olavarria JF, Van Sluyters RC. 1995. Overall pattern of callosal connections in visual cortex of normal and enucleated cats. *J Comp Neurol* 363(2):161-76.

Pallas SL, Littman T, Moore DR. 1999. Cross-modal reorganization of callosal connectivity without altering thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15):8751-6.

Rakic P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241(4862):170-6.

Rhoades RW, Mooney RD, Fish SE. 1984. A comparison of visual callosal organization in normal, bilaterally enucleated and congenitally anophthalmic mice. *Exp Brain Res* 56(1):92-105.

Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M. 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci* 22(15):6549-59.

Simeone A, Acampora D, Gulisano M, Stornaiuolo A, Boncinelli E. 1992a. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358(6388):687-90.

Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E. 1992b. Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J* 11(7):2541-50.

Sur M, Rubenstein JL. 2005. Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* 310(5749):805-10.

Thomas HC, Espinoza SG. 1987. Relationships between interhemispheric cortical connections and visual areas in hooded rats. *Brain Res* 417(2):214-24.

Van Essen DC, Newsome WT, Bixby JL. 1982. The pattern of interhemispheric connections and its relationship to extrastriate visual areas in the macaque monkey. *J Neurosci* 2(3):265-83.

von Melchner L, Pallas SL, Sur M. 2000. Visual behaviour mediated by retinal projections directed to the auditory pathway. *Nature* 404(6780):871-6.

Wagor E, Mangini NJ, Pearlman AL. 1980. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse. *J Comp Neurol* 193(1):187-202.

Wang Q, Burkhalter A. 2007. Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 502(3):339-57.

Wang Q, Gao E, Burkhalter A. 2011. Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J Neurosci* 31(5):1905-18.

Wang Q, Sporns O, Burkhalter A. 2012. Network analysis of corticocortical connections reveals ventral and dorsal processing streams in mouse visual cortex. *J Neurosci* 32(13):4386-99.

Yorke CH, Caviness VS. 1975. Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: a study based on anterograde and retrograde methods. *J Comp Neurol* 164(2):233-45.

Yoshida M, Suda Y, Matsuo I, Miyamoto N, Takeda N, Kuratani S, Aizawa S. 1997. *Emx1* and *Emx2* functions in development of dorsal telencephalon. *Development* 124(1):101-11.

Zeki SM. 1977. Simultaneous anatomical demonstration of the representation of the vertical and horizontal meridians in areas V2 and V3 of rhesus monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 195(1121):517-23.

Zeki SM. 1978. The cortical projections of foveal striate cortex in the rhesus monkey. *J Physiol* 277:227-44.

Zeki SM, Sandeman DR. 1976. Combined anatomical and electrophysiological studies on the boundary between the second and third visual areas of rhesus monkey cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 194(1117):555-62.

Table legends

Table 1. Surface of injection sites and of projection zones and percentage of overlap with callosal projections. For each experimental group, the area occupied by each injection site and the sum of the surface occupied by its projection zones is shown for each case. The percentage of overlap between anterograde labeling and callosal projection zones is also shown. Compared to intact mice, the mean percentage of overlap is greater in enucleated and in anophthalmic mice, but it is only significant in the later (Mann-Whitney, $P=0.001$).

Figure legends

Figure 1. Reconstruction of the caudal aspect of the right hemisphere after single BDA injection in V1 of intact, enucleated and anophthalmic mice. Coronal sections were aligned in a rostro-caudal axis to show the patches of anterograde labeling after a single BDA injection in V1. Surrounding V1, patches of projection are labeled and correspond to the extrastriate areas. LI is not shown. The inset shows the transition zone between AL and LM. A: Anterior, RL: Rostrolateral, AL: Anterolateral, LM: Lateromedial, P: Posterior, POR: Post-rhinal, AM: Anteromedial, PM: Posteromedial, MM: Mediomedial. LI: Laterointermediar. Scale bars: 1mm for the reconstruction and 100 μ m in the inset.

Figure 2. Anterograde labeling after PHAL (green) and BDA (red) injections in V1. Labeling is shown for AL (A, C and E) and LM (B, D and F) in intact (A and B), enucleated (C and D) and anophthalmic (E and F) mice Scale bar: 100 μ m

Figure 3. Composite images correspond to whole brain images. A and B are whole brain images acquired under UV light to observe retrograde labeling in the left hemisphere. In C, the composite image obtained after serial reconstructions of coronal sections from case CT1 is shown. This is a dorsal projection of the left hemisphere. Callosal projection zones are in gray and patches of anterograde labeling from PHAL and BDA injections are in green and red, respectively. The delineations of V1 and extrastriate areas from C have been superimposed to the whole brain image in B, where both BDA and PHAL injection sites are also identified. Abbreviations for extrastriate areas are the same as in Figure 1. Scale bar: 1mm

Figure 4. Composite images of intact, enucleated and anophthalmic mice. Dorsal projection images of the left hemisphere are shown for four intact (CT2-CT5), four enucleated (EN1-EN4) and four anophthalmic (AN1-AN4) cases. Case CT1 is shown in Figure 3. In EN4, the PHAL injection failed to produce anterograde labeling. Color code and abbreviations are the same as in Figure 3. Scale bar: 1mm.

Figure 5. Percentage of overlap between projection patches and callosal projection zones. The percentage of overlap is shown in open circles for the most rostral BDA injection and in filled circles for the most caudal PHAL injection. The percentage of overlap is significantly greater in anophthalmic mice than in intact mice when all projection patches are pooled. **: $P < 0.01$.

Table 1

Group	Cases	Injection sites (μm^2)		Projection zones (μm^2)		Overlap (%)	
		BDA	PHAL	BDA	PHAL	BDA	PHAL
Intact	CT1	13806,0	10491,4	94813,8	109647,2	15,26	7,52
	CT2	14145,6	23152,2	36555,3	30306,9	11,46	0,75
	CT3	25174,7	14157,6	190714,8	178695,8	9,87	15,39
	CT4	16280,8	20619,3	89609,8	96211,7	5,38	1,29
	CT5	19678,9	29649,8	83909,4	148182,4	7,94	31,90
	mean	17817,2	19614,1	99120,6	112608,8	9,98	11,37
Enucleated	EN1	18098,5	11710,1	91640,9	91094,8	6,82	25,61
	EN2	14191,7	32819,2	41943,6	120575,7	52,03	58,49
	EN3	15811,4	10754,3	110262,8	40603,7	10,62	13,25
	EN4	474,4	283,2	47558,8	-	16,36	-
	mean	12144,0	18427,9	72851,5	84091,4	21,46	32,45
Anophthalmic	AN1	21496,6	26712,5	68338,6	94796,9	14,18	32,07
	AN2	24370,8	17932,9	124344,2	34783,7	31,61	35,13
	AN3	9960,6	17240,0	180636,5	74807,2	35,08	35,35
	AN4	13942,5	36126,9	70716,1	55517,5	29,88	46,68
	mean	17442,6	24503,1	111008,8	64976,3	27,69	37,31

Figure 1

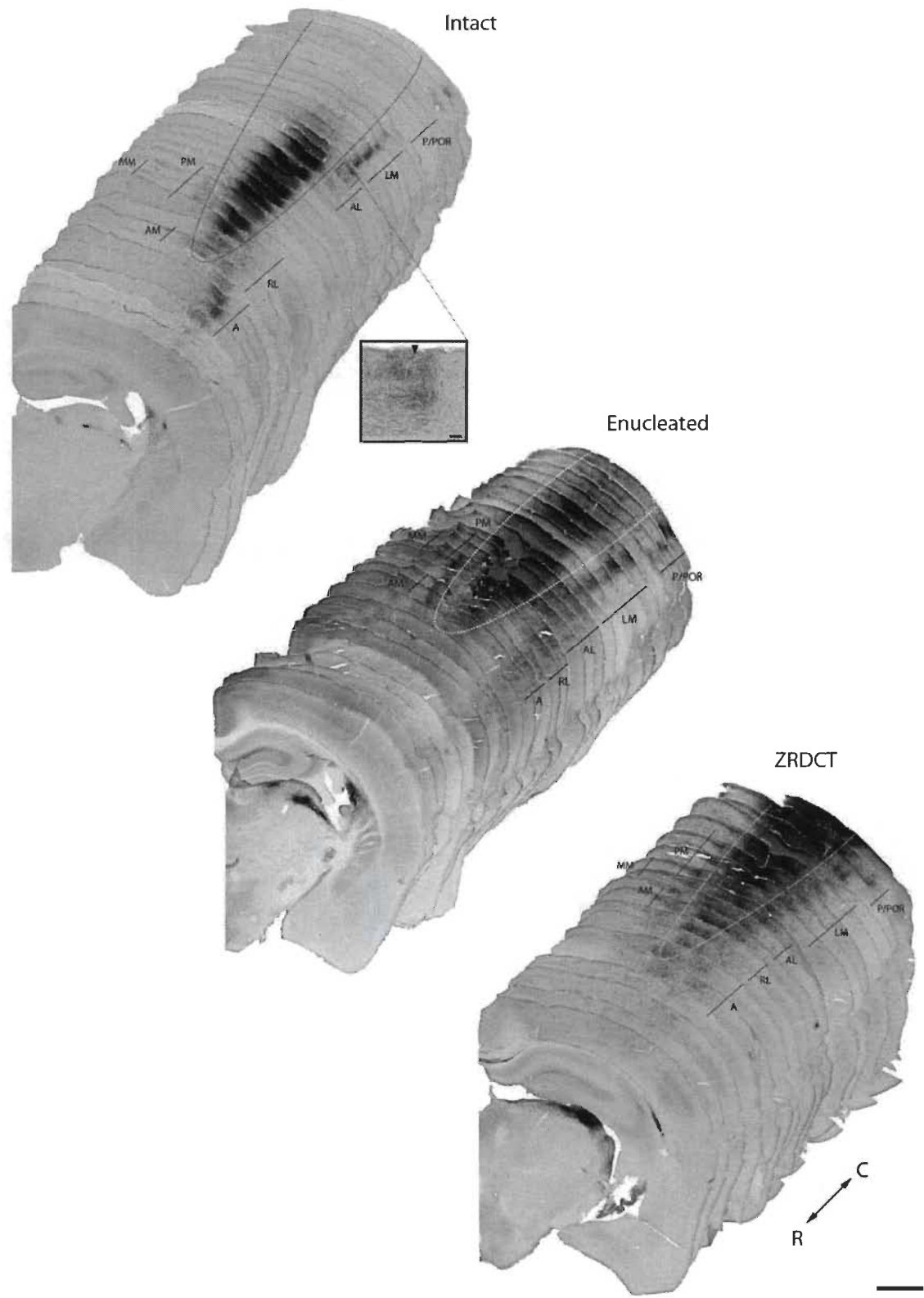


Figure 2

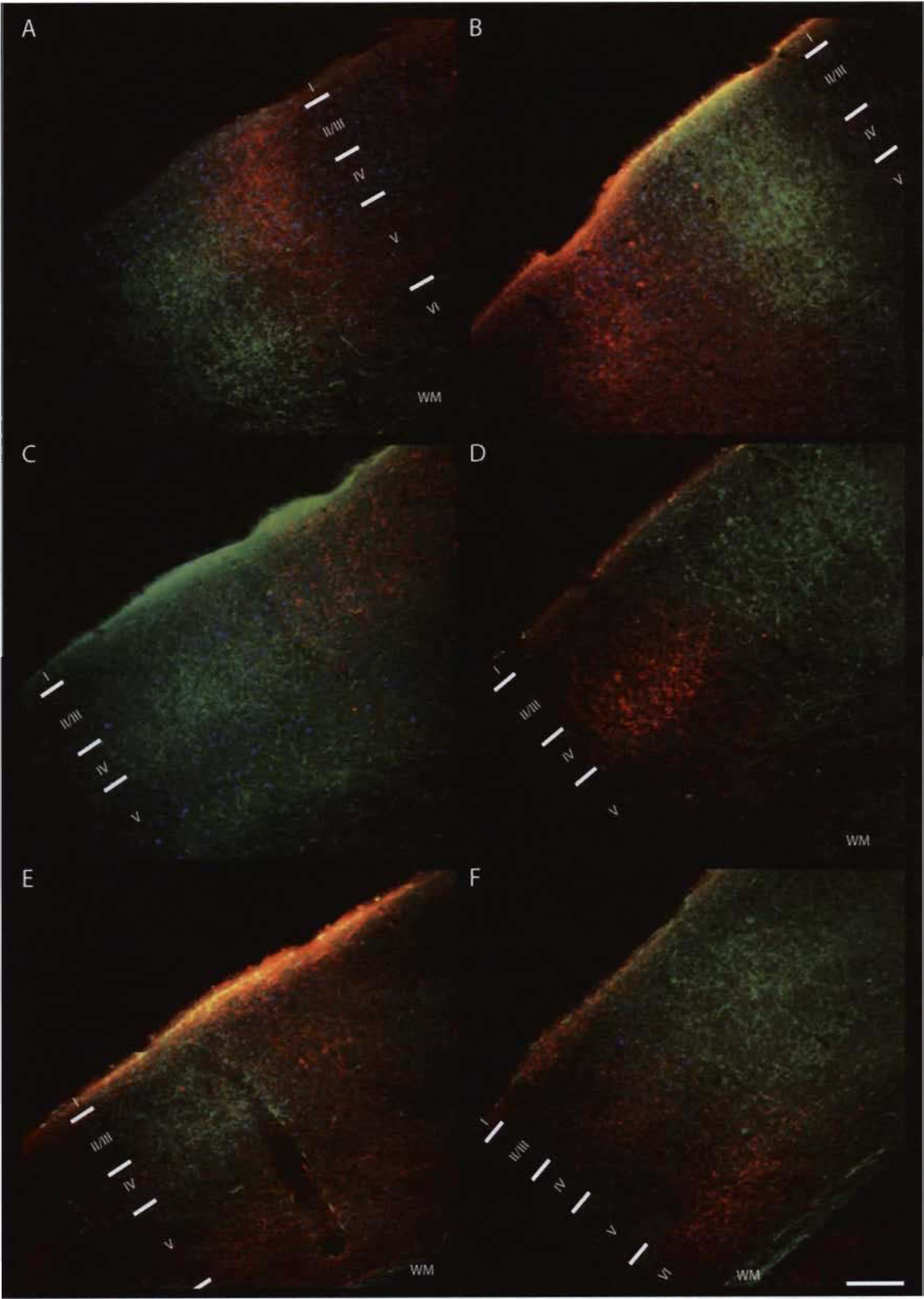


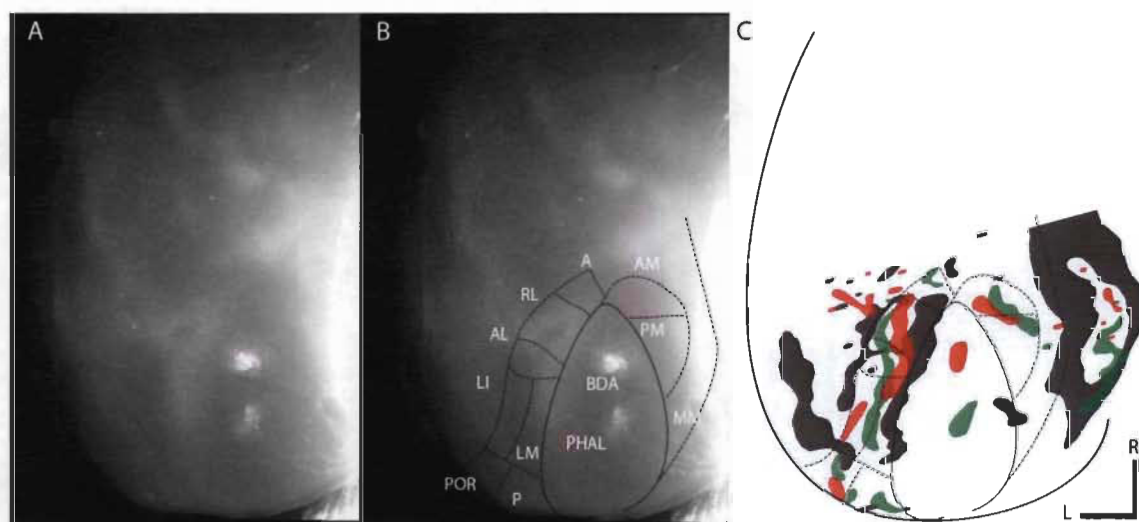
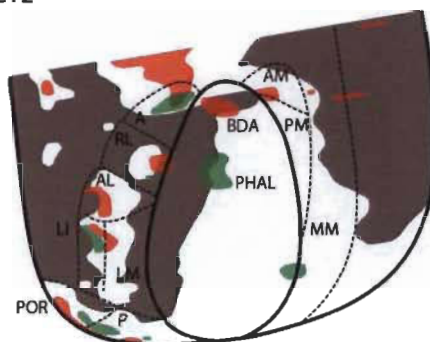
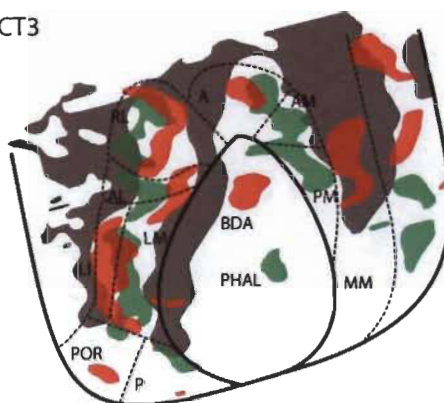
Figure 3

Figure 4a

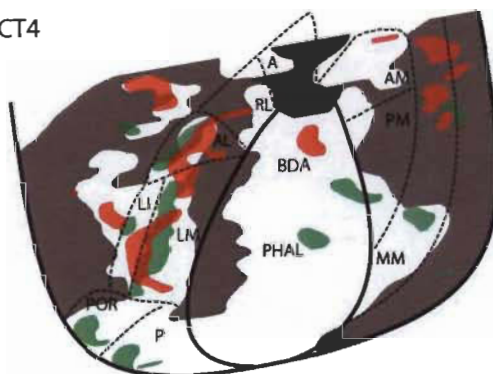
CT2



CT3



CT4



CT5

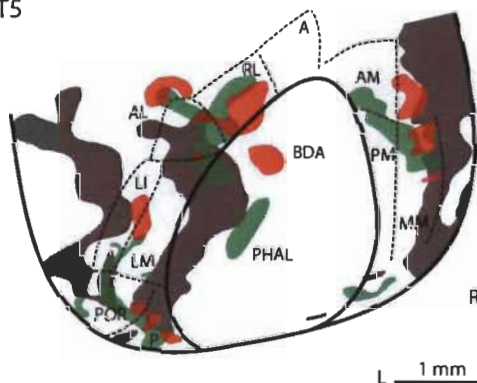


Figure 4b

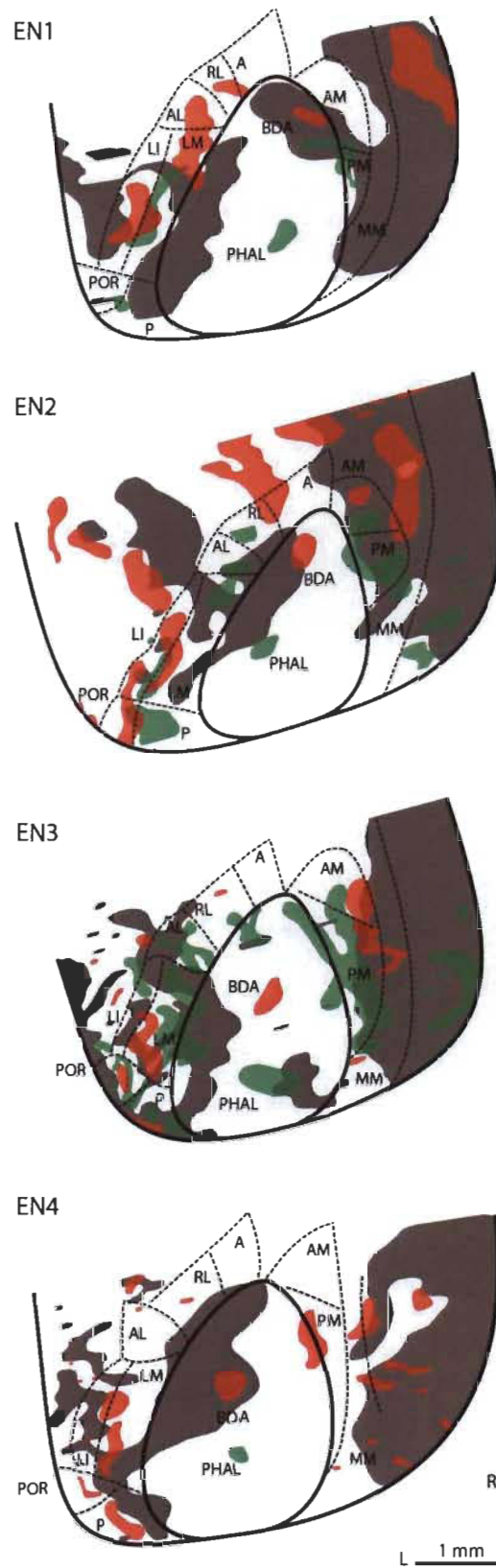
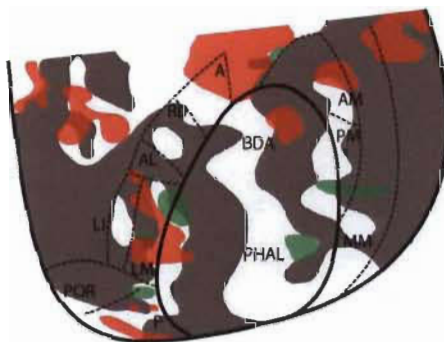
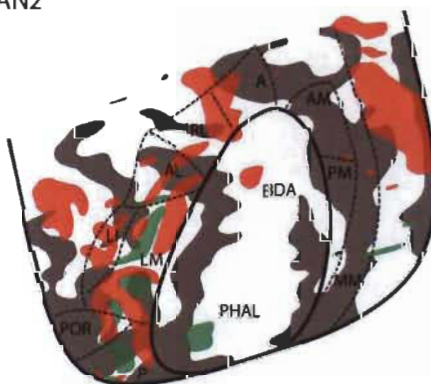


Figure 4c

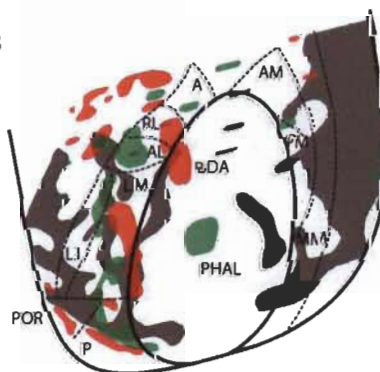
AN1



AN2



AN3



AN4

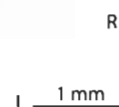
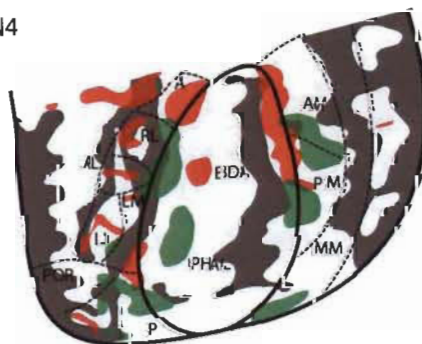
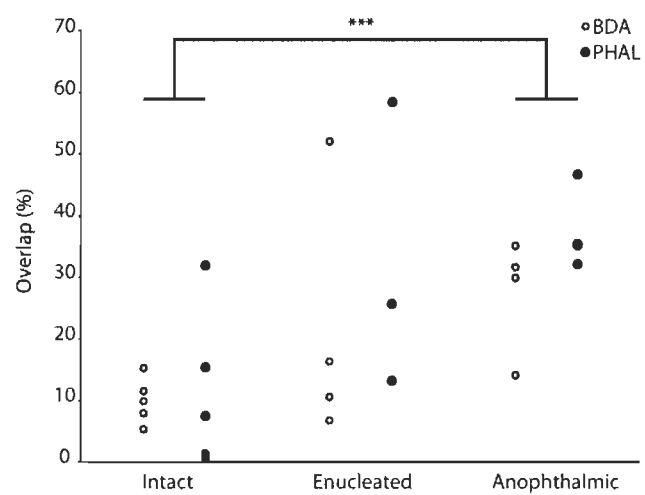


Figure 5

CHAPITRE IV

INDIRECT PATHWAY BETWEEN THE PRIMARY AUDITORY AND VISUAL CORTICES THROUGH LAYER V PYRAMIDAL NEURONS IN V2L IN MOUSE AND THE EFFECTS OF BILATERAL ENUCLEATION

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2011 dans la revue European Journal of Neuroscience: Laramée, M.E., Kurotani, T., Rockalnd, K.S., Bronchti, G. et Boire, D.

Résumé

Les aires corticales visuelles sont activées par un stimulus auditif chez la souris aveugle. Des connexions hétéromodales directes ont été démontrées entre le cortex auditif (A1) et le cortex visuel (V1) primaires et entre A1 et le cortex visuel secondaire (V2). Les afférences auditives dans V2 se terminent à proximité de neurones qui projettent vers V1, et constituent potentiellement une connexion indirecte fonctionnelle entre A1 et V1. Dans cette étude, nous avons injecté un traceur adéroviral qui exprime la protéine verte fluorescente amplifiée sous le promoteur de la synapsine (AdSynEGFP) dans V1 et le traceur antérograde dextran biotinylé dans A1 pour déterminer 1) si les axones de A1 font synapse sur des neurones de la portion latérale de V2 (V2L) qui projettent vers V1 et 2) si cette connexion indirecte est altérée par une énucléation néonatale chez la souris. Des reconstructions tridimensionnelles complètes de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de la couche 5 ont été effectuées et la présence de contacts synaptiques potentiels entre des structures présynaptiques auditives et postsynaptiques visuelles a été vérifiée en microscopie confocale. Ces contacts synaptiques ont été classés en contact de haut et de bas niveau de confiance et ont été cartographiés sur les arbres dendritiques. Puisque tous les neurones pyramidaux de la couche 5 qui ont été reconstruits reçoivent des afférences auditives, nous proposons que V2L soit un relais important entre A1 et V1. Les afférences auditives ont été relocalisées sur les dendrites d'ordre inférieur chez les souris énucléées. Les neurones de V2L sont aussi sujets à des réorganisations dendritiques après la perte de la vision. La connexion A1-V2L-V1 pourrait être impliquée dans l'intégration multisensorielle et pourrait contribuer à l'activation auditive des aires occipitales chez le rongeur aveugle.

Mots-clés : cécité, cortico-cortical, hétéromodal, morphologie, plasticité

Indirect pathway between the primary auditory and visual cortices through layer V pyramidal neurons in V2L in mouse and the effects of bilateral enucleation

Marie-Eve Laramée¹, Tohru Kurotani², Kathleen S. Rockland^{2,3}, Gilles Bronchti¹ et Denis Boire^{1,4}

1. Groupe de Recherche en Neurosciences, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
2. RIKEN-MIT Center for Neural Circuit Genetics, MIT Cambridge, MA, USA, 02116
3. Lab for cortical organization and systematics, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-Shi, Saitama, 351-0198, Japon
4. École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1P1

Abstract

Visual cortical areas are activated by auditory stimuli in blind mice. Direct heteromodal cortical connections have been shown between A1 and V1 and between A1 and V2. Auditory afferents to V2 terminate in close proximity to neurons that project to V1, and potentially constitute an effective indirect pathway between A1 and V1. In this study, we injected a retrograde adenoviral vector that expresses EGFP under a synapsin promotor (AdSynEGFP) in V1 and BDA as an anterograde tracer in A1 to determine 1) whether A1 axon terminals establish synaptic contacts onto V2L neurons that project to V1 and 2) if this indirect cortical pathway is altered by a neonatal enucleation in mice. Complete dendritic arbors of layer V pyramidal neurons were reconstructed in 3D, and putative contacts between pre-synaptic auditory inputs and post-synaptic visual neurons were analyzed using a laser scanning confocal microscope. Putative synaptic contacts were classified as high-confidence and low-confidence contacts and charted onto dendritic trees. As all reconstructed layer V pyramidal neurons received auditory inputs by these criteria, we conclude that V2L acts as an important relay between A1 and V1. Auditory inputs are preferentially located onto lower branch order dendrites in enucleated mice. Also, V2L neurons are subject to morphological reorganizations in both apical and basal dendrites after the loss of vision. The A1-V2L-V1 pathway could be involved in multisensory processing and contribute to the auditory activation of the occipital cortex in the blind rodent.

Keywords: blindness, cortico-cortical, heteromodal, morphology, plasticity

Introduction

Visually deprived humans have greater abilities in processing non-visual stimuli than sighted individuals (Lessard et al 1998; Röder et al 1999; Alary et al 2009; Wan et al 2010). These capabilities appear to be correlated with the activation of their striate and extrastriate visual areas by somatosensory (Sadato et al 1996; Cohen et al 1997; Sadato et al 2004) and auditory (Kujala et al 1995; Gougoux et al 2004; Gougoux et al 2005; Hertrich et al 2009) stimuli. This non-visual activation of the occipital cortex has also been observed in visually deprived mice (Chabot et al 2007; Larsen et al 2009; Van et al 2011), rats (Piche et al 2007), hamsters (Izraeli et al 2002), opossums (Kahn and Krubitzer 2002; Karlen et al 2006), cats (Yaka et al 1999; 2000; Sanchez-Vives et al 2006) and blind mole rats (Heil et al 1991; Bronchti et al 2002). These results suggest underlying cross-modal plasticity following the loss of visual inputs in different species.

Several hypotheses have been proposed to explain how cross-modal interactions are established in visually deprived individuals (Bavelier and Neville 2002). Firstly, subcortical pathways could directly convey non-visual activity to the primary visual cortex (V1). Indeed, the inferior colliculus projects to V1 via direct projections to the lateral geniculate nucleus (LGN) in blind rodents (Doron and Wollberg 1994; Piché et al 2004; Chabot et al 2007). The second hypothesis involves connections to V1 and to the secondary visual area (V2) from parietal, frontal and temporal associative areas, where multisensory processing occurs (Macaluso et al 2000; Calvert 2001; Driver and Noesselt 2008). These multisensory cortical areas project to visual, auditory and somatosensory unisensory cortices (Kennedy and Bullier 1985; Cappe and Barone 2005). The visual cortex in blind subjects could participate in the processing of a non-visual stimulus by amplifying these connections. Finally, visual deprivation could strengthen direct cortico-cortical connections between unimodal primary sensory cortices. The presence of these connections in humans is supported by event-related potentials (Giard and Peronnet 1999) and functional imaging (Klinge et al 2010) studies. Tracing studies in animals also demonstrate direct cortical connections between primary or early sensory cortices in primates (Falchier et al 2002; Rockland and Ojima 2003; Clavagnier et al 2004), cats

(Hall and Lomber 2008) and rodents (Budinger et al 2000; Budinger et al 2006; Campi et al 2010).

Cross-modal cortical activations in the blind could result also in the reorganization of indirect pathways between primary sensory cortices. The existence and importance of indirect pathways is supported by the strong activation of the lateral part of V2 (V2L) following an audio-visual task in the rat (Hirokawa et al 2008), the direct inputs from the primary somatosensory cortex onto the medial part of V2 and by the abundant potential connectivity among multimodal areas surrounding unisensory cortices (Paperna and Malach 1991). Direct projections from the primary auditory cortex (A1) to V2 have been demonstrated in gerbils (Budinger et al 2000), prairie voles (Campi et al 2010) and rats (Miller and Vogt 1984). These projections could operate as a relay for multisensory processing in V1 through direct feedback connections to V1, as observed in primates (Rockland and Pandya 1979; Tigges et al 1981), tree shrews (Lyon et al 1998), cats (Squatrino et al 1981; Symonds and Rosenquist 1984a; Symonds and Rosenquist 1984b; Olavarria 1996) as well as rodents (Olavarria and Montero 1981; Simmons et al 1982; Olavarria and Montero 1989; Coogan and Burkhalter 1990; Olavarria and Montero 1990; Coogan and Burkhalter 1993). In the present study, we set out to investigate whether auditory axons from A1 terminate directly onto V2L neurons that project to V1, and whether this A1-V2L-V1 pathway could be altered by neonatal enucleation in mice.

Methods

To investigate the A1-V2L-V1 pathway and to determine if it is altered by visual deprivation, two neuronal tracers were necessary. The first one, biotinylated dextran amine (BDA, 10 kDa), was injected in A1 to anterogradely label axon terminals in V2L. The second one, an adenoviral vector that expresses EGFP under the neuron-specific promoter synapsin (AdSynEGFP), was injected in V1 to retrogradely label neurons in V2L. This adenovirus tracer produces a Golgi-like labeling of dendritic arbors, including dendritic spines (Tomioka and Rockland 2006). By combining BDA and AdSynEGFP injections in one animal, putative synapses between auditory axons and V2L neurons

can be charted and quantified, using laser scanning confocal microscopy. A similar experimental design was used in a previous study, with the addition of electron microscopy to assess the quality and reliability of dendritic spine labeling by AdSynEGFP injections (Ichinohe et al 2008).

Mice

Twelve C57BL/6 mice, bilaterally enucleated at birth, and fourteen sighted controls were used in this study. They were all adults (between 90-120 days) when the injections were performed. All experimental procedures were approved by the Safety Division of the RIKEN Institute and were carried out in biosafety level 2 facilities in accordance with National Institutes of Health (NIH) Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules and Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80-23).

Neonatal enucleation

C57BL/6 pups were bilaterally enucleated within 24h of birth. By this time, thalamocortical axons have already reached the subplate but not the cortex (Clancy et al 2001). Once the pups were deeply anaesthetized by hypothermia, the palpebral fissure was opened with a scalpel and, after the optic nerve and ophthalmic artery were sectioned, eyeballs were extracted. At the end of the surgery, pups were warmed under a heat lamp and returned to their nest when fully awakened.

Injections and tissue processing

Eight controls and five bilaterally enucleated mice received single injections of AdSynEGFP in V1 to enable subsequent complete 3D reconstructions of V2L neurons. Mice were anaesthetized with a solution of chloral hydrate (400mg/kg body weight) and 0.5 μ L of AdSynEGFP (1.5×10^{12} pfu/ml) was injected in V1, 3.8mm posterior and 2.6mm lateral to Bregma at a depth of 600 μ m. Pressure injections were performed at a rate of

0.06 μ L/min using a 30 μ m glass pipette tip glued onto a Hamilton syringe. After 14 days of survival, animals were anesthetized with urethane (1.5mg/kg body weight) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffer (PB) at pH7.4. The brains were extracted and post-fixed in the 4% PFA solution for 2-3h. After a 24h cryoprotection period in 30% sucrose, they were frozen and cut in 50 μ m coronal sections with a freezing microtome. Sections were washed in phosphate buffered saline (PBS) and blocked in 5% normal goat serum (NGS) containing 0.5% Triton-X-100 and 0.1M PBS (PBS-TX). These sections were thereafter processed for the immunoperoxidase staining.

The remaining six control mice and seven enucleated mice were used for the confocal analysis of putative contacts between auditory axons and V2L neurons that project onto V1. The same injection protocol as above was performed but, in these mice, in addition to the AdSynEGFP injection in V1, 0.3mL of BDA 10kDa (Molecular probes; 10%) was injected in A1, 2.9mm posterior and 4.2mm lateral to Bregma at a 400 μ m depth. The speed of injection and size of pipette tip were the same as for the V1 injections.

For the initial part of the experiment, one section out of eight in two control and two enucleated mice that received both injections was processed with the immunoperoxidase staining to determine if coextensive areas of auditory axons and visual neurons existed within V2L. These cases also helped to validate the sensitivity and quality of the labeling for both tracers. The remaining sections from these animals, and all sections of the other mice, were processed for the immunofluorescence staining.

Immunoperoxidase staining

Sections were blocked in PBS-TX+NGS for 1h30 and incubated overnight at room temperature in the primary antibody solution of 0.5 μ g/mL of rabbit anti-GFP antibody (Tomioaka and Rockland 2006). PBS was then used to wash the sections before a 2h incubation in the biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody solution (Vector Labs; 1:200). After washes in PB, sections were incubated in an ABC solution (Vector Labs;

1:200) and reacted with 3,3-diaminobenzidine. Following the last washes in PB, sections were mounted on gelatinized slides, dehydrated and counterstained with Cresyl Violet before being cover-slipped.

Immunofluorescence staining

For confocal analysis, the EGFP and BDA fluorescence were amplified as follows. After 1h30 of blocking in PBS-TX+NGS, sections were incubated overnight at room temperature in the primary antibody solution, made with 2 μ g/mL of rabbit anti-GFP antibody (Tomioka and Rockland 2006) in PBS-TX+NGS. The next day, sections were washed in PBS and placed in a solution of Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit polyclonal goat antibody (Molecular Probes; 1:200) and Alexa Fluor 594-conjugated streptavidin (Molecular Probes; 1:200) in PBS-TX+NGS for 2h. After being washed in PB, they were directly mounted on cover-slips to minimize the working distance and to improve the quality of confocal images. The sections were then dried at 4°C in the dark and, finally, the cover-slips were mounted on slides with Immu-Mount (Thermo Scientific) mounting media.

Data analysis

Immunoperoxidase staining

In animals that only received AdSynEGFP in V1, Nissl staining was used to validate the location of injection sites and localization of neurons, in relation to established areal cytoarchitectonic features (Caviness 1975; Paxinos and Franklin 2001). Complete 3D reconstructions of 24 retrogradely labeled V2L neurons (12 from each experimental group) were afterward performed to determine if bilateral enucleation at birth alters neuronal morphology. For this study, it was essential to make sure that the complete dendritic arbors were reconstructed. For this reason, neurons had to be isolated in an area where there were not too many entangled dendrites that could confound the reconstruction process. Also, to be sure all parts of the dendritic tree were completely reconstructed, the end of a dendrite had to be identified as round and in the middle depth

of the section or, in the case that it finished at the top or bottom of one section, the absence of labeling in the next one was verified. Usually, dendritic arbors were found in up to six consecutive 50 μ m thick sections.

In animals that received both injections in A1 and V1, sections that were reacted with the immunoperoxidase staining protocol were used to confirm the existence of coextensive labeling between auditory axons and V2L neurons, and to validate the location of injection sites (Caviness 1975). In addition, the intensity and quality of the immunoperoxidase staining was used as reference for spine and axon high-resolution labeling.

Immunofluorescence staining

In the immunofluorescence material, validation of injection sites and area delineation were, at first, performed using brain landmarks and projection patterns. That is, all injections were verified based on the coronal plane of the section (Paxinos and Franklin 2001). Further, injections were deemed in V1 if they resulted in retrogradely labeled neurons in both secondary visual areas and in the lateral geniculate nucleus. In the case of injections in A1, the presence of anterogradely labeled axons in the medial geniculate nucleus was required. After all neurons were fully reconstructed and analyzed, boundaries of injections sites were delineated with Neurolucida (MicroBrightField) before unmounting the coverslips for Nissl staining, to subsequently validate injections sites and location of reconstructed neurons.

In areas where retrogradely labeled layer V neurons were coextensive with anterogradely labeled auditory axons in V2L, confocal images were taken over the entire thickness of the section with a Leica TCS SP2 AOBS laser scanning confocal microscope (40X objective; 183.11nm voxel size, Z step= 488.4nm, no zoom, 2048 x 2048 image frame size, pinhole AE=1.5). Neurons were randomly selected before any synaptic contacts were examined between auditory axons and V2L neurons that project onto V1. Serial sections, on which parts of the dendritic arbor were found, were scanned

and the image stacks were imported in Neurolucida (MicroBrightField) to enable the 3D reconstructions of neurons using the Neuron Tracing tool. Blood vessels and parts of dendrites from other neurons were used to facilitate the alignment of the tracing through adjacent sections. The same requirements as above were applied to select a neuron for analysis. Using these criteria, a total of ten neurons were completely reconstructed: five from three control mice and five from two bilaterally enucleated mice. Additional candidate neurons for analysis were found in the four animals that had sections reacted with the immunoperoxidase staining procedure, but these were excluded from confocal microscopy analysis because parts of retrogradely labeled V2L neurons' dendritic trees appeared to be missing from the fluorescence material.

During 3D reconstructions of dendritic arbors, all sites of close proximity between pre-synaptic auditory axons and post-synaptic dendritic spines were identified and tagged as putative contacts for further investigation at higher magnification (see Figure 3a). Each one of these sites was subsequently scanned at 1000X magnification (36.6nm voxel size, Z step = 122.1nm, zoom 4x, 1024 x 1024 image frame size, pinhole AE=1) for further classification as potential synaptic sites. As previously proposed, two levels of probability were used to categorize the putative contacts (Ichinohe et al 2008). *High confidence* level contacts were characterized by the presence of yellow pixels between the pre- and post-synaptic elements, in at least two of the three axes, and no black pixels in the third axis (see Figure 3b). This was interpreted as demonstrating the close proximity between the auditory axon and a dendritic spine. *Low confidence* level contacts were characterized by a close proximity between the auditory axon and dendritic spine in at least two of the three axes, but without yellow pixels (see Figure 3c). If there were black pixels in two or more axes, the putative contact was discarded (see Figure 3d). High and low confidence contacts were then charted throughout the dendritic tree of 3D reconstructed neurons.

Morphological parameters and information concerning the distribution of auditory inputs were obtained with Neurolucida Explorer (MicroBrightField). A total of thirty-eight morphological parameters were analyzed: (1) number of branches, (2) number of nodes

(nodes are intersections within the tree), (3) number of dendritic spines, (4) total length, (5) surface (area occupied by the dendritic tree), (6) spine density, (7) average diameter and (8) maximal branch order (branch order represents the level in the hierarchy of the branching pattern for each dendrite, using the centripetal method from MicroBrightField). These eight parameters were analyzed within the apical dendrite, basal dendrites, oblique dendrites and apical tuft. For apical and basal dendrites, (9) the maximal terminal distance (the farthest ending of the dendritic tree in respect to the cell body) was also analyzed. In addition, (10) the cell body area, (11) the distance from the cell body of the apical tuft and (12) the distribution of oblique dendrites along the apical dendrite were compared. Finally, (13) the distribution of bifurcating nodes with respect to their relative straight line distance from the cell body was compared between both groups for apical and basal dendrites.

Auditory inputs were charted and compared between groups based on confidence level, the total number of contacts onto V2L neurons, their number in the apical and basal dendrites, their distribution onto these dendrites, their distance from the cell body and their distribution onto branch orders for both apical and basal dendrites.

For Figure 1 only, images of injection sites and labeling in V2L were taken using an Olympus BX51W1 microscope coupled to a Hamamatsu EM-CCD digital camera and to the NeuroLucida software.

Statistical analysis

Non-parametric Mann-Whitney U tests were performed to test the differences of morphological parameters and number of synaptic contacts between the two experimental groups. Two-Sample Kolmogorov-Smirnov tests were used to compare the distribution of contacts along dendritic trees and branch orders and the distribution of bifurcating nodes along dendritic trees. Normality was verified using the One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test. If the parameter had a normal distribution, Student t-tests were performed to compare the means. All statistical analyses were carried out with SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc) with a significance level of $p < 0.05$.

Results

Validation of the immunofluorescence staining

When the quality of labeling was compared between immunoperoxidase and immunofluorescence staining, no significant differences were observed. The enhancement of native EGFP and BDA resulted in high-resolution labeling of the spines and axons that were commensurate with that found in the immunoperoxidase reacted sections. This indicated that confocal microscopy is suitable to observe putative synaptic contacts without missing dendritic spines or axon varicosities when analyzed at high magnification.

Injection sites

In both immunoperoxidase and immunofluorescence material, AdSynEGFP injections in V1 were validated using Nissl staining. They were all large (350 μ m to 500 μ m in diameter) and covered all cortical layers without encroaching on the subcortical white matter (Figure 1a). Retrogradely labeled neurons were found in V2L in supragranular and infragranular layers (Figure 1b), but most of them were layer V pyramidal neurons. All BDA injection sites were in A1, as confirmed by the Nissl staining. In two control mice, however, the injection was located at the medial border of A1, close to the dorsal part of the auditory cortex. In all cases, anterogradely labeled axons were observed in V2L after BDA injections in A1 (300 μ m to 400 μ m in diameter) (Figure 1c). In the lateral part of V2L, auditory axons were found in all cortical layers. More medially, however, axons were restricted to supragranular and infragranular layers (Figure 1d).

V2L neuron morphology

All reconstructed neurons were layer V pyramids and they were judged to have a complete labeling of their dendritic arbor (see Methods). We focused on layer V neurons from V2L for the sake of efficiency and because they are the major source of feedback

cortico-cortical connections to V1 in rodents (Budinger et al 2000; Bai et al 2004), whereas layer II/III neurons are mainly involved in feedforward projections.

Twelve neurons from each group were completely reconstructed to compare their morphology and to determine if enucleation affects layer V pyramidal neurons in V2L (see Figure 2). All layer V pyramidal neurons that project onto V1 in control and enucleated mice had an apical dendrite that extended up to the superficial layers and basal dendrites that were mainly confined within layer V. However, some distinctions were observed. Indeed, it appears that neurons in blind mice had sparse basal dendrites that extended far away from the cell body (neurons #15, 16, 17, 23 and 24). Only one cell from the sighted group had a basal dendritic arbor that looks similar (neuron #9). In controls, the basal tree was usually highly ramified close to the soma. As for the apical tuft, it was usually heavily branched in control mice, except for neuron #9, in comparison to the ones from enucleated mice. This slight arborization of the tuft in blind mice is particularly evident for neurons #15, 16, 17, 20 and 22. The distribution of oblique dendrites along the apical dendrite appears closer to the cell body in control mice. In control mice, neurons #2, 3, 4, 8, 10 and 12 had an asymmetrical basal dendritic arborization, whereas there were only two slightly asymmetrical cells (#15 and 23) in enucleated mice.

When V2L neurons' morphological parameters were quantitatively compared between control and enucleated mice, only six out of the thirty-seven analyzed parameters were significantly different. For the basal dendrites, there was an inferior number of nodes in enucleated mice ($P=0.010$), which resulted in lower branch orders ($P=0.014$). The maximal terminal distance of these basal dendrites was, however, increased after the loss of visual inputs ($P=0.001$). The number of nodes ($P=0.039$) and branch orders ($P=0.020$) in oblique dendrites were significantly greater in control mice. Finally, the cell body area was bigger in blind mice ($P=0.033$). None of the remaining morphological parameters were significantly different between both groups (see Table 1).

One neuron in the sighted group (cell1) was an outlier for almost all morphological parameters. To determine the power of our analysis and to select which parameters were consistently reorganized in blind mice, we did that analysis again without cell1. Withdrawing this cell from the statistical analysis shows that only four morphological parameters were changed in the blind. There was a reduction in the number of nodes ($P=0.019$) and branch order ($P=0.027$) onto basal dendrites whereas their maximal terminal distance ($P=0.001$) was increased. Also, the number of branch orders ($P=0.037$) in oblique dendrites were significantly lower (see Table 1). Therefore, we consider that these four parameters are the main ones that are significantly altered by the loss of visual inputs.

Morphology of V2L neurons receiving auditory inputs

AdSynEGFP injections in V1 retrogradely labeled V2L neurons in layers II/III and V in areas of coextensive anterograde labeling following BDA injections in the auditory cortex. However, only pyramidal neurons from layer V were chosen for reconstruction and for the analysis of putative auditory inputs. They were randomly selected over V2L, without prior knowledge of the status of actual auditory inputs.

A total of ten retrogradely labeled layer V neurons in V2L were selected for NeuroLucida reconstructions (from both control ($n=5$) and blind ($n=5$) mice) (Figure 4a and 4b). They were all pyramidal neurons with a conspicuous apical dendrite extending to layer I and basal dendrites mainly confined to layer V. The reconstructed neurons exhibited diverse morphological features (see Figure 4). For example, apical dendrites were straight or bifurcated ("forked"). In both groups, two neurons had a bifurcating apical dendrite (enucleated: #31 and #33, control: #27 and #28). In addition, the extent of apical dendritic arborization in layer I differed for each neurons. In some cases, only few branches reached the pial surface (enucleated: #33, control: #25 and #26), whereas other neurons had a dense arborization within layer I. From the enucleated mice, neuron #34 had no oblique dendrites branching from its apical dendrite whereas many were observed for neuron #29 from the control group. One cell (#33) in the enucleated group

had a very large basal dendritic arborization that extended down to the bottom of layer VI. Conversely, another cell (#31) had a very small basal dendritic arborization. Finally the basal dendritic arborization was asymmetrical in two neurons, one from each group (enucleated: #31, control: #25). Given this apparent diversity, no clear dichotomy could be established between the two experimental groups.

Complete 3D reconstructions of dendritic arbors allowed for a quantitative analysis of neuronal morphology. To assess whether these neurons were altered by visual deprivation, the same morphological parameters as above were analyzed (see Table 2).

We also compared the distribution of the relative straight line distance from the soma of nodes along apical and basal dendrites. In neurons reacted with the immunoperoxidase staining, the distribution of nodes over the apical ($P = 0.141$) and basal ($P = 0.265$) dendrites were not significantly different between groups. In neurons involved in the A1-V2L-V1 pathway, however, the distribution of nodes along the apical dendrites ($P = 0.000$), but not for basal dendrites ($P = 0.735$), was reorganized (Figure 5). Bifurcating nodes are mainly located close to the cell body in controls, whereas they are mostly found at the apical tuft in enucleated mice. This is in agreement with qualitative observations (see above and Figure 4).

A1-V2L-V1 pathway

From areas in V2L where auditory axons and visual neuron dendrites were in close proximity (Figure 3a), a total of 453 putative synaptic contacts in control and 485 in enucleated mice were evaluated using high magnification laser scanning confocal microscopy. The majority of these putative contacts were rapidly discarded because dark pixels were found between pre- and post-synaptic membranes. The remaining 56 synaptic contacts in sighted and 46 in blind mice were thereafter sorted as high confidence or low confidence level synapses according to validated criteria (Ichinohe et al 2008). With this technique, every BDA-labeled synaptic contact was charted onto the dendritic arbor of each layer V pyramidal neuron in V2L. All of the reconstructed

neurons in both enucleated and control groups were found to receive auditory inputs of both confidence levels (Figure 4).

The number of high and low confidence auditory inputs, the localization of these synaptic contacts over dendritic compartments (Table 3) and their distribution with respect to the distance from the soma, were not different between control and enucleated mice. Indeed, the number of synaptic contacts (low confidence, $P= 0.739$; high confidence, $P= 0.796$) was not altered after the loss of vision. The localization of low confidence (apical, $P= 0.548$; basal, $P= 0.310$) and high confidence contacts (apical, $P= 0.310$; basal, $P= 0.841$) contacts onto dendritic segments was also similar between groups. Furthermore, the percentage of high and low confidence contacts, with respect to the total number of inputs, was not different in blind mice for both apical (low confidence, $P= 0.690$; high confidence, $P= 0.690$) and basal dendrites (low confidence, $P= 0.690$; high confidence, $P= 0.421$). This indicates that visual deprivation did not alter auditory inputs onto apical and basal dendrites of layer V pyramidal neurons in V2L. When auditory inputs were grouped by 50 μ m intervals for each level of confidence, their distribution onto the apical dendrite was not different between both groups (low confidence: $P= 0.343$; high confidence: $P= 0.482$). The same was found concerning the auditory inputs onto basal dendrites (low confidence: $P= 0.542$; high confidence: $P= 0.254$).

Even if the number of auditory inputs onto each dendritic compartment is the same, it is possible that they are differently organized in respect to the 3D organization of the dendritic tree in enucleated mice. To further investigate this, the distribution of auditory inputs onto dendritic branch order was analyzed. Interestingly, both high ($P= 0.024$) and low ($P= 0.037$) confidence contacts were differently distributed over the apical dendrite, whereas their distribution was similar onto basal dendrites (low confidence: $P= 0.776$; high confidence: $P= 0.147$). Because only low confidence contacts onto the apical dendrite represented a normal population in both groups, t-test was applied only to these to reveal a significant difference between experimental groups ($P= 0.007$). Indeed, there were more contacts onto low order dendrites in enucleated than in control mice (enucleated: 5.04; control: 7.03) (Figure 6).

After all neurons were completely reconstructed and all putative auditory inputs were analyzed, Nissl staining was used to verify and confirm the laminar and intra-areal location of each neuron (Figure 7).

Discussion

V2L neuron morphology

From the immunoperoxidase material, twelve neurons of each group were reconstructed. Several parameters were shown to be significantly different. In enucleated mice, the basal dendrites had fewer nodes, lower branch order, and longer maximal terminal distance and their oblique dendrites had lower branch orders. All of these morphological changes could increase the probability of receiving inputs and the firing rate of the cells. In enucleated mice, layer V pyramidal neurons from V2L that project onto V1 have basal dendrites that conspicuously extend farther away from the soma than control mice. This could increase the probability to receive more and varied inputs from diverse sources. However, this elongation of dendritic branches has one major drawback. Indeed, because of the filtering properties of the dendritic membrane, inputs located far away from the soma do not have a high probability to generate excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) (Williams and Stuart 2002; Williams and Stuart 2003). On the other hand, the summation of many subthreshold inputs might be sufficient to cause the neuron to depolarize. This has already been suggested to be involved in multisensory processing (Allman and Meredith 2007; Allman et al 2008; Allman et al 2009). Also, the basal dendrites of V2L neurons in enucleated mice had fewer bifurcating nodes and lower branch orders and oblique dendrites had lower branch orders. Terminations onto low order dendrites (equivalent to fewer branch points before reaching the cell body) could result in stronger EPSPs to the soma.

A1-V2L-V1 pathway

Anterogradely labeled axons were found in V2L after BDA injections in A1. This is consistent with previous studies that have shown direct projections from A1 to V2 in the gerbil (Budinger et al 2000), prairie vole (Campi et al 2010) and monkeys (Falchier et al 2002). Neurons responding to non-visual modalities have been found in V1 and V2 (Wallace et al 2004) and facilitating audiovisual interactions were observed in these cortical areas in rats (Hirokawa et al 2008).

All reconstructed layer V pyramidal neurons in both groups received auditory inputs. This is quite surprising considering that they were randomly selected prior that any auditory input being demonstrated. This is the first circuit-level demonstration of this indirect pathway. The anatomical findings are consistent with previous electrophysiological studies that revealed audiovisual interactions in extrastriate visual areas; namely, in posterolateral lateral sulcus (PLLS) of cats (Clemo et al 2008) and V2L in rats (Barth et al 1995; Wallace et al 2004). The anatomical organization is further consistent with a role for V2L in audio-visual facilitation, operating by decreased reaction time to audio-visual stimuli (Hirokawa et al 2008), and a consequent enhancement of multisensory integration at the first level of cortical processing. It takes about 8ms to activate A1 after an auditory stimulation in awake rats (Hall and Borbely 1970) and about 6ms for the minimal onset latency to be detected in supragranular layers of A1 after activation of the medial geniculate thalamic nucleus in thalamocortical slices of mice (Broicher et al 2010). The shortest latency recorded in V1 of macaque monkeys after a visual activation is 20-30ms (Maunsell and Gibson 1992; Nowak et al 1995) and 40ms in awake rats (Boyes and Dyer 1983). Auditory information that is being conveyed to V1 by the A1-V2L-V1 pathway could therefore be synchronized with the first visual inputs in the visual cortex. Such synchrony between stimuli is known to be required for multisensory processing (Calvert et al 2000; Spence and Squire 2003). In blind mice, as there are no visual inputs from the retina, visual cortical neurons that receive afferents from the A1-V2L-V1 pathway could be dedicated to the processing of auditory stimuli or to a combination of auditory and somatosensory stimuli.

Morphology of the A1-V2L-V1 neurons

From our morphometric analyses, most of the structural parameters used to assess the geometry of pyramidal cells that receive auditory inputs were not significantly different between sighted and blind mice, except for the distribution of bifurcating nodes over the dendritic tree. This is unexpected considering that neurons from the immunoperoxidase staining showed reorganization of their basal and oblique dendrites, but not of the distribution of bifurcating nodes. There are two possible explanations to this discrepancy in the modulation of the V2L neurons' morphology between both conditions: 1) there are not enough data about the A1-V2L-V1 neurons or 2) V2L neurons that are involved in the A1-V2L-V1 pathway represent a distinct population of neuron.

The apical dendrites of V2L neurons involved in the indirect connection between A1 and V1 in control mice mainly arborized close to the soma, whereas it is the apical tuft that is highly arborized in enucleated mice. The organization of the apical dendrite in sighted mice indicates that the neurons are mainly ramified in the zone where inputs generate high amplitude EPSP to the cell body (Williams and Stuart 2002; Williams and Stuart 2003). It is therefore quite surprising that, after a visual deprivation, the apical dendrite is reorganized in a way to favor long distance feedback inputs within layer I (Rockland and Ojima 2003) instead of increasing the discharge probabilities of the cell. On the other hand, the inputs that terminate within layer I arise from higher order cortical areas (Kennedy and Bullier 1985; Cappe and Barone 2005) or other unisensory cortices (Rockland and Ojima 2003; Budinger et al 2006), which might subsequently facilitate the recruitment of occipital areas by non-visual stimuli.

Reorganization of the A1-V2L-V1 pathway in blind mice

In our experimental design, the total number of auditory inputs was not changed in blind mice and the distribution over each dendritic compartment was also similar between the groups. However, when the distribution of synaptic contacts onto branch orders is compared, low confidence inputs were mostly found onto low order apical dendrites in blind mice. Since these auditory inputs generate action potentials that have fewer branch

points before reaching the cell body, this could result in stronger EPSPs to the cell body. This would increase the probability of having suprathreshold non-visual inputs in enucleated mice. This idea is supported by the significant activation of V2L found in enucleated mice after an auditory stimulation (Chabot et al 2007).

Direct cortico-cortical connections

Here, we have demonstrated the existence of an indirect pathway between A1 and V1 that appears to be altered in enucleated mice. Tracing studies also demonstrate extensive reorganization of pre-existent cortico-cortical connections between primary sensory cortices in enucleated opossum (Karlen et al 2006), visually impaired mice (Larsen et al 2009) and blind humans (Klinge et al 2010). These studies together with the present report indicate that there are several routes by which auditory information can reach the visual cortex to accomplish a more efficient use of V1 for auditory tasks in the blind.

AdSynEGFP injections in V1 retrogradely labeled a higher proportion of cell bodies in V2L infragranular layers than in supragranular layers. This feedback-like distribution of cells is consistent with previous studies in rodents (Coogan and Burkhalter 1990; Coogan and Burkhalter 1993; Bai et al 2004). Feedback connections are reported to terminate in rodents onto pyramidal neurons in a higher proportion than feedforward projections (Johnson and Burkhalter 1996) and generate EPSPs (Shao and Burkhalter 1996) that are mediated by glutamate receptors (Domenici et al 1995). By extension, feedback connections from neurons in V2L that receive auditory inputs could generate action potentials that activate neurons in V1, after an auditory stimulation.

Retrogradely labeled neurons were also found in layers II/III and some studies have demonstrated that plasticity mechanisms in the adult are stronger in superficial layers (Daw et al 1992; Stern et al 2001; Goel and Lee 2007). It would be interesting to verify if the supragranular component of the indirect pathway in V2L between A1 and V1 is exposed to a stronger reorganization.

Technical considerations

In this study, we aimed to empirically evaluate the A1-V2L-V1 pathway, and to determine its reorganization after a visual deprivation. We also wanted to chart auditory inputs onto the complete dendritic tree of layer V pyramidal neurons. These goals have been addressed by direct visualization of potential contacts between auditory axons from A1 and infragranular V2L neurons that project to V1 using laser scanning confocal microscopy after tracer injections. This experimental design has previously been validated by electron microscopy (Ichinohe et al 2008) and successfully used by other investigators (Shi and Cassell 1993a; Wouterlood et al 2002; Wouterlood et al 2003; Wouterlood et al 2004; Wouterlood et al 2007; Hohensee et al 2008; Wouterlood et al 2008a; Wouterlood et al 2008b; Keniston et al 2010).

We acknowledge that further technical refinements are still needed; for example in terms of electron microscopic validation of actual synapses and the subcellular organization of circuitry at the synaptic and receptor level. In addition, our data does not provide a quantitative evaluation of the convergence and divergence of auditory axons onto visual neurons.

Few procedures are available, however, to evaluate potential synapses over the entire dendritic arbor of a single cell. Recent studies have developed methods for estimating the number of potential synaptic contacts between a single axon and a neuron's dendritic arbor (Stepanyants et al 2002; Stepanyants et al 2008). These studies are based on Monte-Carlo algorithms on randomly rotated arbors of neurons around their z axis to evaluate the probability of connections, based on the distance between axon terminals and dendritic arbors. Other studies have used confocal microscopy and tracer injections to label parts of axons and dendrites with (Wouterlood et al 2002; Wouterlood et al 2004; Ichinohe et al 2008; Keniston et al 2010) or without (Wouterlood et al 2003; Wouterlood et al 2007; Wouterlood et al 2008a) synaptic markers. In these, the complete morphology of the neurons involved is unknown. Confocal microscopy was also used to demonstrate the connection between axons and dendrites from two pre-selected cells, without 3D reconstruction (Shi and Cassell 1993b; Wouterlood et al 2008b). In these

studies, the location of each synaptic contact is therefore undefined. Others have used electron microscopy to validate synapses, but these studies missed information concerning the exact localization of the inputs in respect to the neuron's entire dendritic tree (Johnson and Burkhalter 1996; Johnson and Burkhalter 1997; Kuroda et al 1998). Our study is the first attempt to provide means to estimate the probability distribution of contacts between a population of long distance projecting axons and an entire single cell reconstructed from serial sections.

Conclusion

In this study, we have demonstrated the existence of the A1-V2L-V1 pathway. All V2L neurons reconstructed in our sample were verified as projecting to V1 and also as receiving inputs from A1. Finally, after visual deprivation, we found morphological reorganization in the basal and oblique dendrites arborization and changes in the distribution of oblique dendrites over the apical dendrite. Also, auditory inputs were redistributed towards the lower branch orders after bilateral enucleation at birth. Our results are therefore consistent with the proposal that this indirect cortico-cortical pathway is modified by visual deprivation.

Acknowledgements

We are grateful to Kazumi Ohta for her support and advice concerning viral tracer injections and James Hyde for his help on image processing. Special thanks to Karine Minville for her assistance with confocal microscopy. This work was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada grants to DB and GB and by a Canadian Foundation for Innovation grant to DB, and funding from RIKEN Brain Science Organization to KSR. MEL is supported by an Alexander Graham Bell (NSERC) fellowship and travel to Japan was supported by the Réseau de la Recherche en Santé de la Vision FRSQ.

Abbreviations

A1: primary auditory cortex

AdSYNEGFP: adenoviral vector expressing enhanced GFP under the synapsin promoter

BDA: biotinylated dextran amine

EPSP: excitatory post-synaptic potential

PB: phosphate buffer

PBS: phosphate buffered saline

PBS: phosphate buffered saline containing Triton-X-100

NGS: normal goat serum

V1: primary visual cortex

V2: secondary visual cortex

V2L: secondary visual cortex, lateral part

References

- Alary,F., Duquette,M., Goldstein,R., Elaine,C.C., Voss,P., La Buissonniere-Ariza,V. & Lepore,F. (2009) Tactile acuity in the blind: a closer look reveals superiority over the sighted in some but not all cutaneous tasks. *Neuropsychologia*, **47**, 2037-2043.
- Allman,B.L., Bittencourt-Navarrete,R.E., Keniston,L.P., Medina,A.E., Wang,M.Y. & Meredith,M.A. (2008) Do cross-modal projections always result in multisensory integration? *Cereb.Cortex*, **18**, 2066-2076.
- Allman,B.L., Keniston,L.P. & Meredith,M.A. (2009) Not just for bimodal neurons anymore: the contribution of unimodal neurons to cortical multisensory processing. *Brain Topogr.*, **21**, 157-167.
- Allman,B.L. & Meredith,M.A. (2007) Multisensory processing in "unimodal" neurons: cross-modal subthreshold auditory effects in cat extrastriate visual cortex. *J.Neurophysiol.*, **98**, 545-549.
- Bai,W.Z., Ishida,M. & Arimatsu,Y. (2004) Chemically defined feedback connections from infragranular layers of sensory association cortices in the rat. *Neuroscience*, **123**, 257-267.
- Barth,D.S., Goldberg,N., Brett,B. & Di,S. (1995) The spatiotemporal organization of auditory, visual, and auditory-visual evoked potentials in rat cortex. *Brain Res.*, **678**, 177-190.
- Bavelier,D. & Neville,H.J. (2002) Cross-modal plasticity: Where and how? *Nature Rev.Neurosci.*, **3**, 443-452.
- Boyes,W.K. & Dyer,R.S. (1983) Pattern reversal visual evoked potentials in awake rats. *Brain Res.Bull.*, **10**, 817-823.
- Broicher,T., Bidmon,H.J., Kamuf,B., Coulon,P., Gorji,A., Pape,H.C., Speckmann,E.J. & Budde,T. (2010) Thalamic afferent activation of supragranular layers in auditory cortex *in vitro*: a voltage sensitive dye study. *Neuroscience*, **165**, 371-385.
- Bronchti,G., Heil,P., Sadka,R., Hess,A., Scheich,H. & Wollberg,Z. (2002) Auditory activation of 'visual' cortical areas in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Eur.J.Neurosci.*, **16**, 311-329.
- Budinger,E., Heil,P., Hess,A. & Scheich,H. (2006) Multisensory processing via early cortical stages: connections of the primary auditory cortical field with other sensory systems. *Neuroscience*, **143**, 1065-1083.

Budinger,E., Heil,P. & Scheich,H. (2000) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections. *Eur.J.Neurosci.*, **12**, 2425-2451.

Calvert,G.A. (2001) Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies. *Cereb.Cortex*, **11**, 1110-1123.

Calvert,G.A., Campbell,R. & Brammer,M.J. (2000) Evidence from functional magnetic resonance imaging of crossmodal binding in the human heteromodal cortex. *Curr.Biol.*, **10**, 649-657.

Campi,K.L., Bales,K.L., Grunewald,R. & Krubitzer,L. (2010) Connections of Auditory and Visual Cortex in the Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*): Evidence for Multisensory Processing in Primary Sensory Areas. *Cereb.Cortex*, **20**, 89-108.

Cappe,C. & Barone,P. (2005) Heteromodal connections supporting multisensory integration at low levels of cortical processing in the monkey. *Eur.J.Neurosci.*, **22**, 2886-2902.

Caviness,V.S. (1975) Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J.Comp.Neurol.*, **164**, 247-263.

Chabot,N., Robert,S., Tremblay,R., Miceli,D., Boire,D. & Bronchti,G. (2007) Audition differently activates the visual system in neonatally enucleated mice compared with anophthalmic mutants. *Eur.J.Neurosci.*, **26**, 2334-2348.

Clancy,B., Darlington,R.B. & Finlay,B.L. (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, **105**, 7-17.

Clavagnier,S., Falchier,A. & Kennedy,H. (2004) Long-distance feedback projections to area V1: implications for multisensory integration, spatial awareness, and visual consciousness. *Cogn.Affect.Behav.Neurosci.*, **4**, 117-126.

Clemo,H.R., Sharma,G.K., Allman,B.L. & Meredith,M.A. (2008) Auditory projections to extrastriate visual cortex: connectional basis for multisensory processing in "unimodal" visual neurons. *Exp.Brain Res.*, **191**, 37-47.

Cohen,L.G., Celnik,P., Pascual-Leone,A., Corwell,B., Faiz,L., Dambrosia,J., Honda,M., Sadato,N., Gerloff,C., Catalá,M.D. & Hallett,M. (1997) Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. *Nature*, **389**, 180-183.

Coogan,T.A. & Burkhalter,A. (1990) Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex. *Exp.Brain Res.*, **80**, 49-53.

Coogan,T.A. & Burkhalter,A. (1993) Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J.Neurosci.*, **13**, 3749-3772.

Daw,N.W., Fox,K., Sato,H. & Czepita,D. (1992) Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex. *J.Neurophysiol.*, **67**, 197-202.

Domenici,L., Harding,G.W. & Burkhalter,A. (1995) Patterns of synaptic activity in forward and feedback pathways within rat visual cortex. *J.Neurophysiol.*, **74**, 2649-2664.

Doron,N. & Wollberg,Z. (1994) Cross-modal neuroplasticity in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*: a WGA-HRP tracing study. *Neuroreport*, **5**, 2697-2701.

Driver,J. & Noesselt,T. (2008) Multisensory interplay reveals crossmodal influences on 'sensory-specific' brain regions, neural responses, and judgments. *Neuron*, **57**, 11-23.

Falchier,A., Clavagnier,S., Barone,P. & Kennedy,H. (2002) Anatomical evidence of multimodal integration in primate striate cortex. *J.Neurosci.*, **22**, 5749-5759.

Giard,M.H. & Peronnet,F. (1999) Auditory-visual integration during multimodal object recognition in humans: a behavioral and electrophysiological study. *J.Cogn.Neurosci.*, **11**, 473-490.

Goel,A. & Lee,H.K. (2007) Persistence of experience-induced homeostatic synaptic plasticity through adulthood in superficial layers of mouse visual cortex. *J.Neurosci.*, **27**, 6692-6700.

Gougoux,F., Lepore,F., Lassonde,M., Voss,P., Zatorre,R.J. & Belin,P. (2004) Neuropsychology: pitch discrimination in the early blind. *Nature*, **430**, 309.

Gougoux,F., Zatorre,R.J., Lassonde,M., Voss,P. & Lepore,F. (2005) A functional neuroimaging study of sound localization: visual cortex activity predicts performance in early-blind individuals. *PLoS.Biol.*, **3**, e27.

Hall,A.J. & Lomber,S.G. (2008) Auditory cortex projections target the peripheral field representation of primary visual cortex. *Exp.Brain Res.*, **190**, 413-430.

Hall,R.D. & Borbely,A.A. (1970) Acoustically evoked potentials in the rat during sleep and waking. *Exp.Brain Res.*, **11**, 93-110.

Heil,P., Bronchti,G., Wollberg,Z. & Scheich,H. (1991) Invasion of the visual cortex by the auditory system in the naturally blind mole rat. *Neuroreport*, **2**, 735-738.

Hertrich,I., Dietrich,S., Moos,A., Trouvain,J. & Ackermann,H. (2009) Enhanced speech perception capabilities in a blind listener are associated with activation of fusiform gyrus and primary visual cortex. *Neurocase*, **15**, 163-170.

Hirokawa,J., Bosch,M., Sakata,S., Sakurai,Y. & Yamamori,T. (2008) Functional role of the secondary visual cortex in multisensory facilitation in rats. *Neuroscience*, **153**, 1402-1417.

Hohensee,S., Bleiss,W. & Duch,C. (2008) Correlative electron and confocal microscopy assessment of synapse localization in the central nervous system of an insect. *J.Neurosci.Methods*, **168**, 64-70.

Ichinohe,N., Hyde,J., Matsushita,A., Ohta,K. & Rockland,K.S. (2008) Confocal mapping of cortical inputs onto identified pyramidal neurons. *Front.Biosci.*, **13**, 6354-6373.

Izraeli,R., Koay,G., Lamish,M., Heicklen-Klein,A.J., Heffner,H.E., Heffner,R.S. & Wollberg,Z. (2002) Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. *Eur.J.Neurosci.*, **15**, 693-712.

Johnson,R.R. & Burkhalter,A. (1996) Microcircuitry of forward and feedback connections within rat visual cortex. *J.Comp.Neurol.*, **368**, 383-398.

Johnson,R.R. & Burkhalter,A. (1997) A polysynaptic feedback circuit in rat visual cortex. *J.Neurosci.*, **17**, 7129-7140.

Kahn,D.M. & Krubitzer,L. (2002) Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 11429-11434.

Karlen,S.J., Kahn,D.M. & Krubitzer,L. (2006) Early blindness results in abnormal corticocortical and thalamocortical connections. *Neuroscience*, **142**, 843-858.

Keniston,L.P., Henderson,S.C. & Meredith,M.A. (2010) Neuroanatomical identification of crossmodal auditory inputs to interneurons in somatosensory cortex. *Exp.Brain Res.*, **202**, 725-731.

Kennedy,H. & Bullier,J. (1985) A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *J.Neurosci.*, **5**, 2815-2830.

Klinge,C., Eippert,F., Roder,B. & Buchel,C. (2010) Corticocortical connections mediate primary visual cortex responses to auditory stimulation in the blind. *J Neurosci.*, **30**, 12798-12805.

Kujala,T., Huotilainen,M., Sinkkonen,J., Ahonen,A.I., Alho,K., Hämäläinen,M.S., Ilmoniemi,R.J., Kajola,M., Knuutila,J.E.T., Lavikainen,J., Salonen,O., Simola,J., Standertskjöld-Nordenstam,C.-G., Tiitinen,H., Tissari,S.O. & Näätänen,R. (1995) Visual cortex activation in blind humans during sound discrimination. *Neurosci.Lett.*, **183**, 143-146.

Kuroda,M., Yokofujita,J. & Murakami,K. (1998) An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Prog.Neurobiol.*, **54**, 417-458.

Larsen,D.D., Luu,J.D., Burns,M.E. & Krubitzer,L. (2009) What are the Effects of Severe Visual Impairment on the Cortical Organization and Connectivity of Primary Visual Cortex? *Front.Neuroanat.*, **3**, 30.

Lessard,N., Pare,M., Lepore,F. & Lassonde,M. (1998) Early-blind human subjects localize sound sources better than sighted subjects. *Nature*, **395**, 278-280.

Lyon,D.C., Jain,N. & Kaas,J.H. (1998) Cortical connections of striate and extrastriate visual areas in tree shrews. *J.Comp.Neurol.*, **401**, 109-128.

Macaluso,E., Frith,C.D. & Driver,J. (2000) Modulation of human visual cortex by crossmodal spatial attention. *Science*, **289**, 1206-1208.

Maunsell,J.H. & Gibson,J.R. (1992) Visual response latencies in striate cortex of the macaque monkey. *J.Neurophysiol.*, **68**, 1332-1344.

Miller,M.W. & Vogt,B.A. (1984) Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor, and association cortices. *J.Comp.Neurol.*, **226**, 184-202.

Nowak,L.G., Munk,M.H., Girard,P. & Bullier,J. (1995) Visual latencies in areas V1 and V2 of the macaque monkey. *Vis.Neurosci.*, **12**, 371-384.

Olavarria,J. (1996) Non-mirror-symmetric patterns of callosal linkages in areas 17 and 18 in cat visual cortex. *J.Comp.Neurol.*, **366**, 643-655.

Olavarria,J. & Montero,V.M. (1981) Reciprocal connections between the striate cortex and extrastriate cortical visual areas in the rat. *Brain Res.*, **217**, 358-363.

Olavarria, J. & Montero, V.M. (1989) Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections. *Vis.Neurosci.*, **3**, 59-69.

Olavarria, J. & Montero, V.M. (1990) Elaborate organization of visual cortex in the hamster. *Neurosci.Res.*, **8**, 40-47.

Paperna, T. & Malach, R. (1991) Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat. *J.Comp.Neurol.*, **308**, 432-456.

Paxinos, G.E. & Franklin, K.B.J. (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd edition* Academic Press, San Diego.

Piche, M., Chabot, N., Bronchti, G., Miceli, D., Lepore, F. & Guillemot, J.P. (2007) Auditory responses in the visual cortex of neonatally enucleated rats. *Neuroscience*, **145**, 1144-1156.

Piché, M., Robert, S., Miceli, D. & Bronchti, G. (2004) Environmental enrichment enhances auditory takeover of the occipital cortex in anophthalmic mice. *Eur.J.Neurosci.*, **20**, 3463-3472.

Rockland, K.S. & Ojima, H. (2003) Multisensory convergence in calcarine visual areas in macaque monkey. *Int.J.Psychophysiol.*, **50**, 19-26.

Rockland, K.S. & Pandya, D.N. (1979) Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey. *Brain Res.*, **179**, 3-20.

Röder, B., Teder-Sälejärvi, W., Sterr, A., Rösler, F., Hillyard, S.A. & Neville, H.J. (1999) Improved auditory spatial tuning in blind humans. *Nature*, **400**, 162-166.

Sadato, N., Okada, T., Kubota, K. & Yonekura, Y. (2004) Tactile discrimination activates the visual cortex of the recently blind naive to Braille: a functional magnetic resonance imaging study in humans. *Neurosci.Lett.*, **359**, 49-52.

Sadato, N., Pascual-Leone, A., Grafman, J., Ibañez, V., Deiber, M.P., Dold, G. & Hallett, M. (1996) Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects. *Nature*, **380**, 526-528.

Sanchez-Vives, M.V., Nowak, L.G., Descalzo, V.F., Garcia-Velasco, J.V., Gallego, R. & Berbel, P. (2006) Crossmodal audio-visual interactions in the primary visual cortex of the visually deprived cat: a physiological and anatomical study. *Prog.Brain Res.*, **155**, 287-311.

Shao,Z. & Burkhalter,A. (1996) Differential balance of excitation and inhibition in forward and feedback circuits of rat visual cortex. *J.Neurosci.*, **16**, 7353-7365.

Shi,C. & Cassell,M.D. (1993a) Combination of intracellular staining of retrogradely labeled neurons and anterograde fluorescent tracing: use of the confocal laser scanning microscope. *J.Neurosci.Methods*, **47**, 23-31.

Shi,C. & Cassell,M.D. (1993b) Combination of intracellular staining of retrogradely labeled neurons and anterograde fluorescent tracing: use of the confocal laser scanning microscope. *J.Neurosci.Methods*, **47**, 23-31.

Simmons,P.A., Lemmon,V. & Pearlman,A.L. (1982) Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *J.Comp.Neurol.*, **211**, 295-308.

Spence,C. & Squire,S. (2003) Multisensory integration: maintaining the perception of synchrony. *Curr.Biol.*, **13**, R519-R521.

Squatrito,S., Galletti,C., Battaglini,P.P. & Sanseverino,E.R. (1981) Bilateral cortical projections from cat visual areas 17 and 18. An autoradiographic study. *Arch.Ital.Biol.*, **119**, 1-20.

Stepanyants,A., Hirsch,J.A., Martinez,L.M., Kisvarday,Z.F., Ferecsko,A.S. & Chklovskii,D.B. (2008) Local potential connectivity in cat primary visual cortex. *Cereb.Cortex*, **18**, 13-28.

Stepanyants,A., Hof,P.R. & Chklovskii,D.B. (2002) Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron*, **34**, 275-288.

Stern,E.A., Maravall,M. & Svoboda,K. (2001) Rapid development and plasticity of layer 2/3 maps in rat barrel cortex in vivo. *Neuron*, **31**, 305-315.

Symonds,L.L. & Rosenquist,A.C. (1984a) Corticocortical connections among visual areas in the cat. *J.Comp.Neurol.*, **229**, 1-38.

Symonds,L.L. & Rosenquist,A.C. (1984b) Laminar origins of visual corticocortical connections in the cat. *J.Comp.Neurol.*, **229**, 39-47.

Tigges,J., Tigges,M., Anschel,S., Cross,N.A., Letbetter,W.D. & McBride,R.L. (1981) Areal and laminar distribution of neurons interconnecting the central visual cortical areas 17, 18, 19, and MT in squirrel monkey (*Saimiri*). *J.Comp.Neurol.*, **202**, 539-560.

- Tomioka,R. & Rockland,K.S. (2006) Improved Golgi-like visualization in retrogradely projecting neurons after EGFP-adenovirus infection in adult rat and monkey. *J.Histochem.Cytochem.*, **54**, 539-548.
- Van,B.L., Gerits,A. & Arckens,L. (2011) Evidence for Cross-Modal Plasticity in Adult Mouse Visual Cortex Following Monocular Enucleation. *Cereb.Cortex*.
- Wallace,M.T., Ramachandran,R. & Stein,B.E. (2004) A revised view of sensory cortical parcellation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 2167-2172.
- Wan,C.Y., Wood,A.G., Reutens,D.C. & Wilson,S.J. (2010) Congenital blindness leads to enhanced vibrotactile perception. *Neuropsychologia*, **48**, 631-635.
- Williams,S.R. & Stuart,G.J. (2002) Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons. *Science*, **295**, 1907-1910.
- Williams,S.R. & Stuart,G.J. (2003) Role of dendritic synapse location in the control of action potential output. *Trends Neurosci.*, **26**, 147-154.
- Wouterlood,F.G., Bockers,T. & Witter,M.P. (2003) Synaptic contacts between identified neurons visualized in the confocal laser scanning microscope. Neuroanatomical tracing combined with immunofluorescence detection of post-synaptic density proteins and target neuron-markers. *J.Neurosci.Methods*, **128**, 129-142.
- Wouterlood,F.G., Boekel,A.J., Aliane,V., Belien,J.A., Uylings,H.B. & Witter,M.P. (2008a) Contacts between medial and lateral perforant pathway fibers and parvalbumin expressing neurons in the subiculum of the rat. *Neuroscience*, **156**, 653-661.
- Wouterlood,F.G., Boekel,A.J., Kajiwara,R. & Belien,J.A. (2008b) Counting contacts between neurons in 3D in confocal laser scanning images. *J.Neurosci.Methods*, **171**, 296-308.
- Wouterlood,F.G., Boekel,A.J., Meijer,G.A. & Belien,J.A. (2007) Computer-assisted estimation in the CNS of 3D multimarker 'overlap' or 'touch' at the level of individual nerve endings: a confocal laser scanning microscope application. *J.Neurosci.Res.*, **85**, 1215-1228.
- Wouterlood,F.G., Van,H.T., Blijleven,N., Perez-Templado,P. & Perez-Templado,H. (2002) Double-label confocal laser-scanning microscopy, image restoration, and real-time three-dimensional reconstruction to study axons in the central nervous system and their contacts with target neurons. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.*, **10**, 85-95.

Wouterlood,F.G., Van,H.T., Eijkhoudt,M., Baks-Te-Bulte,L., Goede,P.H. & Witter,M.P. (2004) Input from the presubiculum to dendrites of layer-V neurons of the medial entorhinal cortex of the rat. *Brain Res.*, **1013**, 1-12.

Yaka,R., Yinon,U., Rosner,M. & Wollberg,Z. (2000) Pathological and experimentally induced blindness induces auditory activity in the cat primary visual cortex. *Exp.Brain Res.*, **131**, 144-148.

Yaka,R., Yinon,U. & Wollberg,Z. (1999) Auditory activation of cortical visual areas in cats after early visual deprivation. *Eur.J.Neurosci.*, **11**, 1301-1312.

Table legends

Table 1. Morphological properties of 24 reconstructed layer V pyramidal neurons in V2L. Twelve neurons from each experimental group have been completely reconstructed in 3D. As indicated in the table, this analysis has been performed two times: the first one with all 24 neurons, the second one with only 23 neurons because cell 1, from the control group, was shown to be an outlier. After this neuron has been withdrawn from the analysis, some conclusions changed. Medians and *p*-values are presented. Mann-Whitney test was used to compare both groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 2. Morphological properties of the V2L layer V pyramidal neurons in V2L. Ten neurons were reconstructed: 5 from control and 5 from enucleated mice. Medians and *p*-values after Mann-Whitney statistical analysis are given. No significant differences were found for all these morphological parameters between both groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 3. Auditory inputs onto layer V pyramidal neurons in V1. No significant difference for the number of auditory inputs onto each dendritic compartment was found between control and enucleated mice, as indicated by the Mann-Whitney test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure legends

Figure 1. Tracer injections and labeling in an enucleated mouse. A) AdSynEGFP injection in V1. The injection covered all cortical layers without encroaching on the subcortical white matter. B) Retrogradely labeled neurons in V2L after the injection in V1. Note that they were mainly located in layers II/III and V. C) BDA injection in A1. The injection was large enough to label neurons from all cortical layers. D) Anterogradely labeled axons in V2L. The auditory axons were mainly found in supragranular and infragranular layers. E-G) High magnification of insets in D to show auditory axons located in E) layer I and top layer II/III, F) layer IV and G) layer V. Scale bar: 250 μ m in A and C, 100 μ m in B, 50 μ m in D and 10 μ m in E, F and G.

Figure 2. Morphology of layer V pyramidal neurons from V2L that project onto V1. Twelve layer V pyramidal neurons from control mice (A) and twelve other from enucleated mice (B) were completely reconstructed after single injections in V1. Scale bar: 100 μ m

Figure 3. AdSynEGFP and BDA in V2L. A) Layer V pyramidal neurons retrogradely labeled after AdSynEGFP injection in V1. Each pink circle represents one putative contact that was observed at high magnification to categorize it as a high confidence (B), low confidence (C) or no contact (D). Scale bar: 100 μ m in A and 5 μ m in B, C and D.

Figure 4. Auditory inputs onto V2L layer V pyramidal neurons A) in controls and B) in enucleated mice. Surprisingly, even if they were selected prior knowing if there were auditory inputs onto their dendritic tree, all reconstructed neurons received inputs from A1 onto their apical and basal dendrites. Red squares: high confidence auditory inputs. Green circles: low confidence auditory inputs. Scale bar: 100 μ m

Figure 5. Distribution of bifurcating nodes in relative straight line distance from the soma in neurons receiving auditory inputs. Over the apical dendrite (A), the distribution was changed after bilateral enucleation ($P=0.000$). The median in enucleated mice is 50.5%, whereas it is 20.6% in control mice. For basal dendrites (B), however, the

distribution is not changed ($P= 0.735$). In this dendritic compartment, enucleated and control mice had medians of 20.9% and 18.4%, respectively.

Figure 6. Auditory inputs onto apical and basal dendrites in respect to the branch order. A) High confidence contacts onto apical dendrite. B) Low confidence inputs onto apical dendrites. C) High confidence contacts onto basal dendrites. D) Low confidence contacts onto basal dendrites. Auditory inputs were differently distributed over the apical dendrite (low confidence: $P= 0.037$; high confidence: $P= 0.024$) but not onto basal dendrites (low confidence: $P= 0.776$; high confidence: $P= 0.147$).

Figure 7. Validation of the location of the reconstructed neurons. After all neurons were analysed, Nissl staining was used to confirm their localization in V2L. A) Nissl staining of the section corresponding to cell #33. B) High magnification of the inset in A to show cytoarchitectonic features of V2L. Note that cell #33 was overlaid onto the section to show its exact localization within layer V of V2L. C) Confocal images montage for cell #33 (arrow). The montage fits within the inset in B. D) Cell #33 resize to match the magnification of both B and C. The 3D reconstruction is the same as in Figure 4. Scale bar: 500 μ m in A and 100 μ m in B, C and D.

Table 1

Dendritic compartment	Morphological parameters	Controls	Controls (without cell 1)	Enucleated	p value (All neurons)	p value (Without cell1)
Basal dendrites	Number of dendrites	6	6	5	0.478	0.413
	Number of nodes	27	27	17	0.010*	0.019*
	Number of spines	522.5	551	547	0.551	0.695
	Total length (μm)	2430.2	2401.1	2604.9	0.478	0.449
	Surface (μm^2)	3218.1	3443.7	2804.3	0.356	0.347
	Spine density (spines/ μm)	0.23	0.25	0.20	1.000	0.740
	Maximal terminal distance (μm)	119.6	119.6	141.0	0.001**	0.001**
	Average diameter (μm)	0.47	0.48	0.44	0.319	0.211
	Maximal branch order	6	6.0	5	0.014*	0.027*
Apical dendrite	Number of dendrites	1	1	1	1.000	1.000
	Number of nodes	13	12.0	9.5	0.089	0.151
	Number of spines	236.5	246	194.5	0.514	0.525
	Total length (μm)	848.1	845.9	805.2	0.755	1.000
	Surface (μm^2)	2086.2	2070.0	1687.1	0.178	0.288
	Spine density (spines/ μm)	0.27	0.27	0.25	1.000	0.740
	Maximal terminal distance (μm)	379.7	379.6	460.6	0.143	0.059
	Average diameter (μm)	0.77	0.79	0.86	0.843	1.000
	Maximal branch order	11	11.0	9	0.551	0.786
Apical tuft	Number of dendrites	2	2	2	1.000	0.976
	Number of nodes	7.5	7.0	2.5	0.060	0.104
	Number of spines	101.5	107.0	94	0.630	0.608
	Total length (μm)	597.7	577.6	425.1	0.291	0.413
	Surface (μm^2)	810.3	761.1	469.6	0.160	0.235
	Spine density (spines/ μm)	0.21	0.21	0.22	0.799	0.976
	Average diameter (μm)	0.49	0.50	0.43	0.378	0.347
	Maximal branch order	5	5.0	2.5	0.052	0.091
	Distance from the cellbody (μm)	252.1	248.9	323.7	0.052	0.016*
Oblique dendrites	Number of dendrites	4	4.0	4	0.266	0.118
	Number of nodes	6.5	6.0	4	0.039*	0.069
	Number of spines	200	166.0	244	0.478	0.449
	Total length (μm)	757.3	743.9	975.1	0.266	0.151
	Surface (μm^2)	874.6	857.6	883.2	0.843	1.000
	Spine density (spines/ μm)	0.24	0.26	0.21	0.977	0.695
	Average diameter (μm)	0.40	0.41	0.37	0.101	0.069
	Maximal branch order	4	4.0	3	0.020*	0.037*
	Distribution	0.05	0.05	0.09	0.052	0.016*
Cellbody	Area (μm^2)	1137.7	1160.9	1287.5	0.033*	0.051

Table 2

Dendritic compartment	Morphological parameters	Controls	Enucleated	<i>p</i> value
Basal dendrites	Number of dendrites	5.0	6	0.421
	Number of nodes	32.0	28.0	0.421
	Number of spines	164.0	215.0	0.841
	Total length (μm)	2159.0	2148.0	1.000
	Surface (μm^2)	3261.5	3927.4	0.690
	Spine density (spines/ μm)	0.10	0.09	1.000
	Maximal terminal distance (μm)	100.8	108.1	0.548
	Average diameter (μm)	0.53	0.63	0.421
	Maximal branch order	7.0	7.0	0.841
Apical dendrite	Number of dendrites	1	1	1.000
	Number of nodes	18.0	22.0	0.310
	Number of spines	160.0	144.0	1.000
	Total length (μm)	1172.0	998.7	0.841
	Surface (μm^2)	3225.4	2546.8	0.690
	Spine density (spines/ μm)	0.16	0.14	0.841
	Maximal terminal distance (μm)	365.0	451.1	0.690
	Average diameter (μm)	0.84	0.78	0.841
	Maximal branch order	12.0	14.0	0.548
Apical tuft	Number of dendrites	2.0	2.0	0.310
	Number of nodes	9.0	17.0	0.310
	Number of spines	82.0	87.0	1.000
	Total length (μm)	636.2	768.1	0.690
	Surface (μm^2)	1591.0	1622.7	0.690
	Spine density (spines/ μm)	0.13	0.10	0.841
	Average diameter (μm)	0.64	0.54	0.841
	Maximal branch order	4.0	7.0	0.172
	Distance from the cellbody (μm)	296.0	370.2	0.548
Oblique dendrites	Number of dendrites	6.0	5.0	1.000
	Number of nodes	7.0	9.0	1.000
	Number of spines	47.0	93.0	0.841
	Total length (μm)	466.9	893.5	0.841
	Surface (μm^2)	632.8	1920.9	0.841
	Spine density (spines/ μm)	0.12	0.10	0.690
	Average diameter (μm)	0.68	0.57	0.690
	Maximal branch order	4.0	4.0	0.690
	Distribution	0.18	0.06	0.095
Cellbody	Area (μm^2)	1009.7	997.8	1.000

Table 3

Dendrites	Group	Cell #	Low confidence	median	<i>p</i>	High confidence	median	<i>p</i>
Apical	control	1	1	5	0.548	2	7	0.310
		2	5			4		
		3	5			7		
		4	4			8		
		5	9			11		
		mean	4.8			6.4		
	enucleated	6	2	3		3	6	
		7	3			3		
		8	3			6		
		9	3			6		
		10	5			8		
		mean	3.2			5.2		
Basal	control	1	6	6	0.310	7	6	0.841
		2	2			4		
		3	4			6		
		4	12			13		
		5	6			2		
		mean	6			6.4		
	enucleated	6	11	6		10	10	
		7	4			2		
		8	6			10		
		9	6			13		
		10	8			9		
		mean	7			8.8		

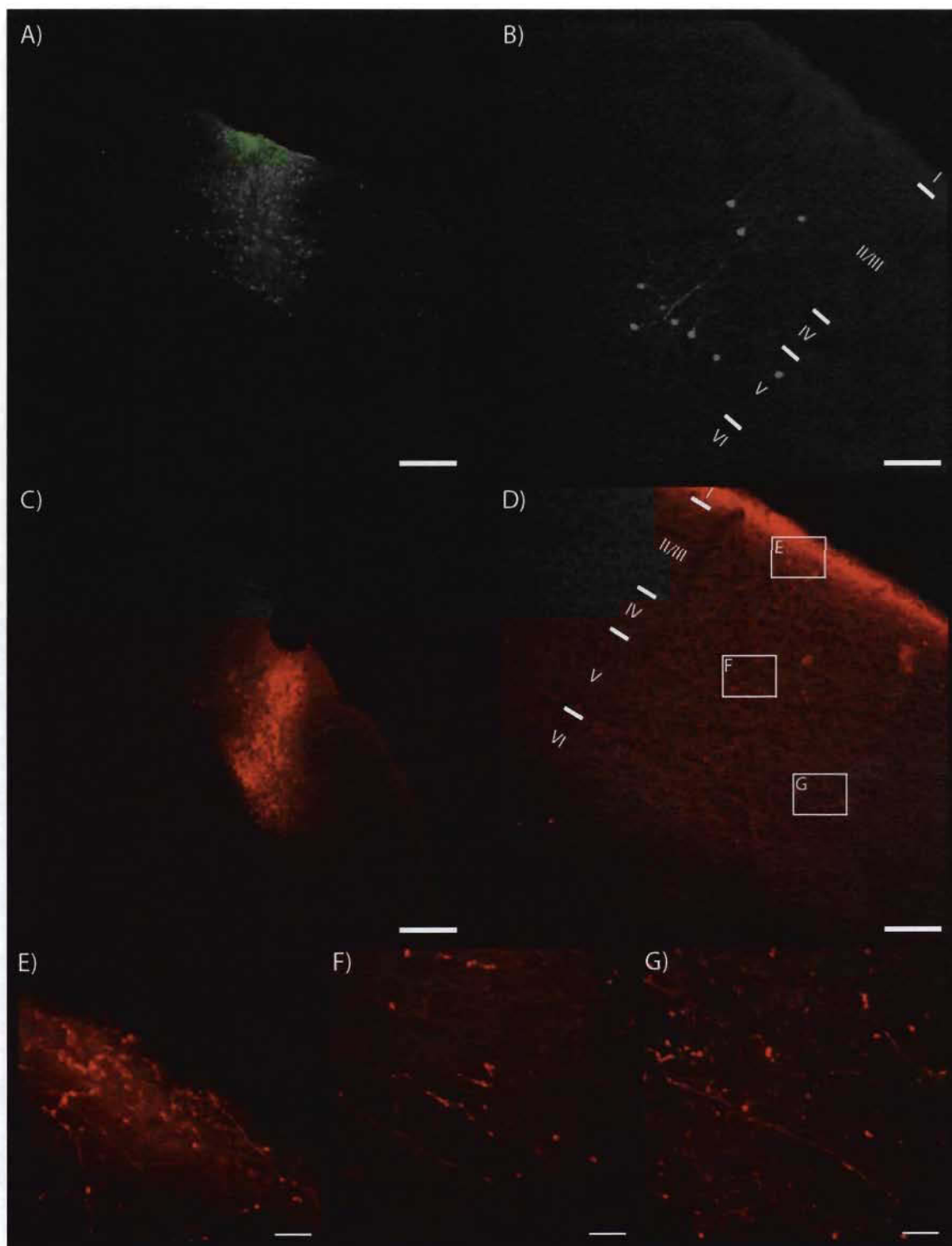
Figure 1

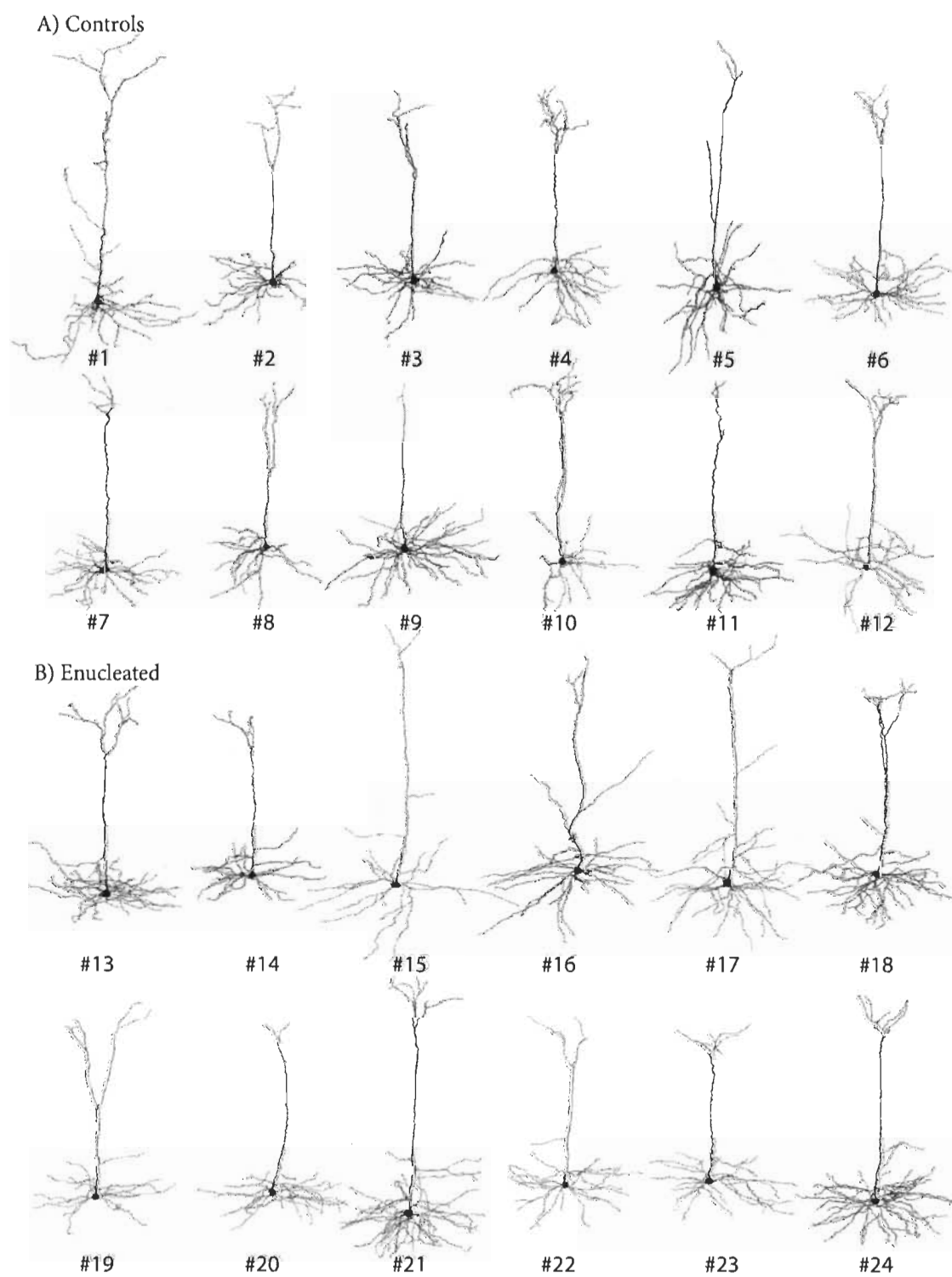
Figure 2

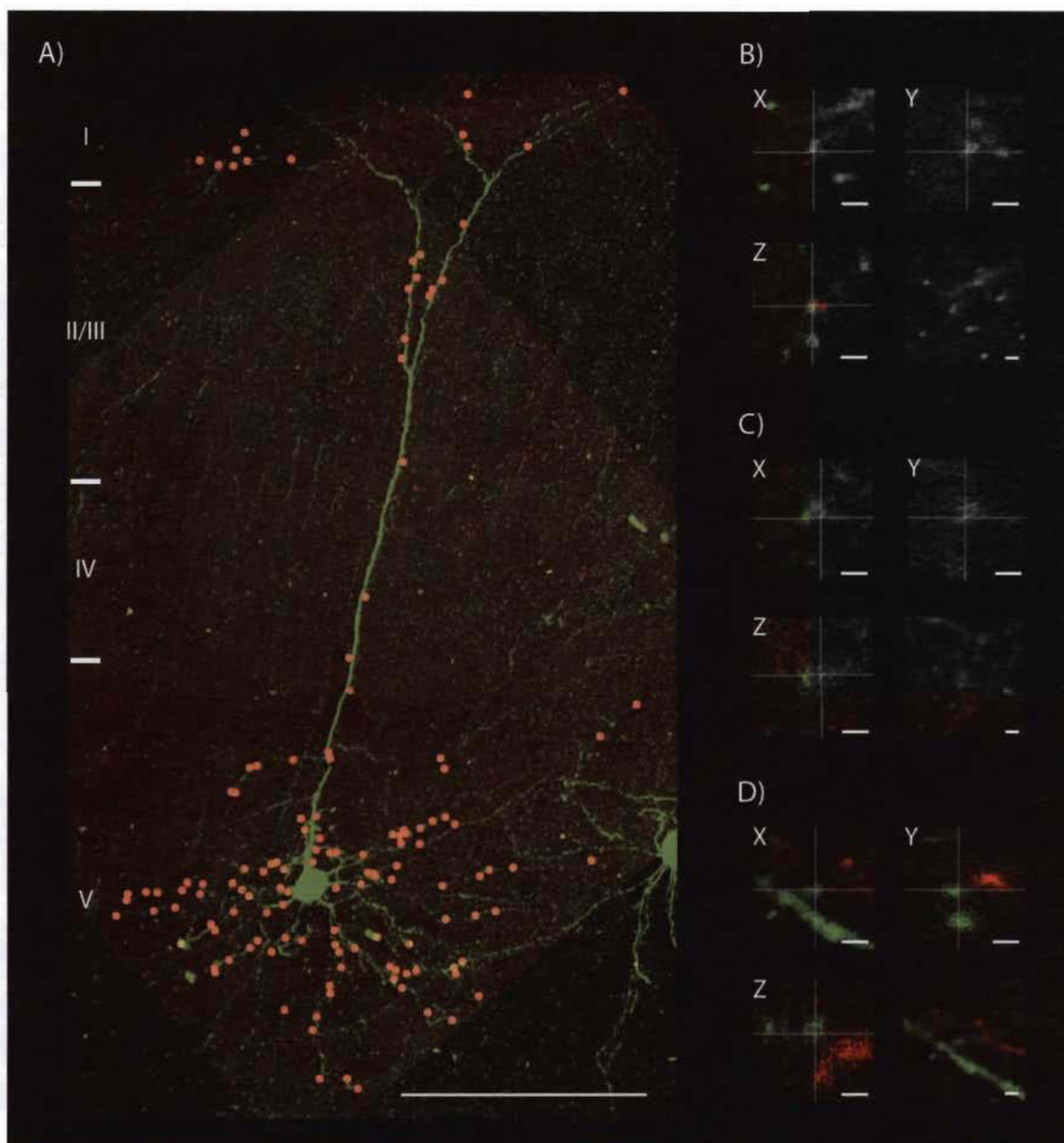
Figure 3

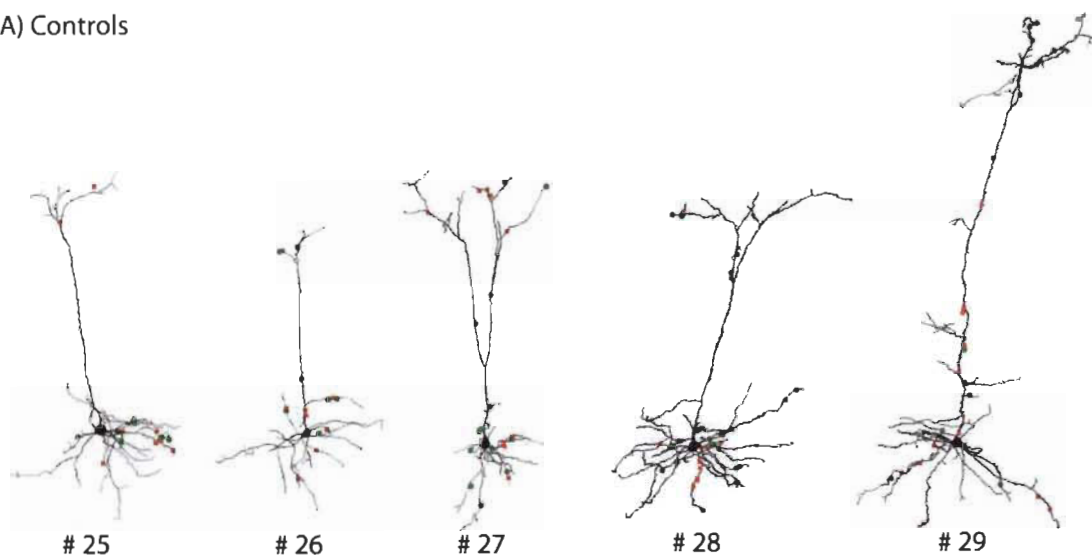
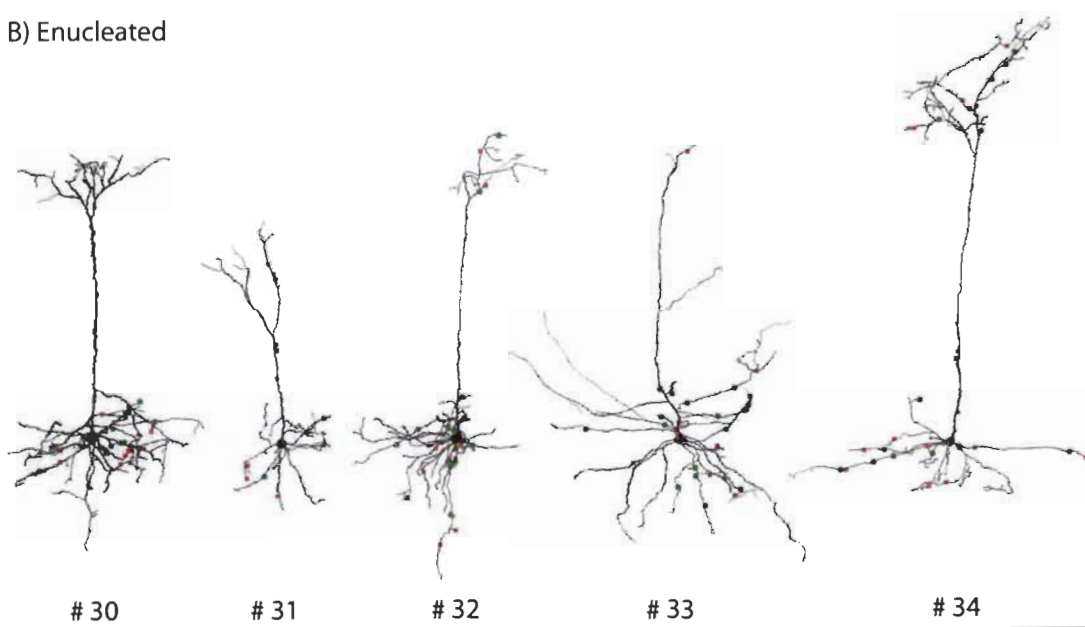
Figure 4**A) Controls****B) Enucleated**

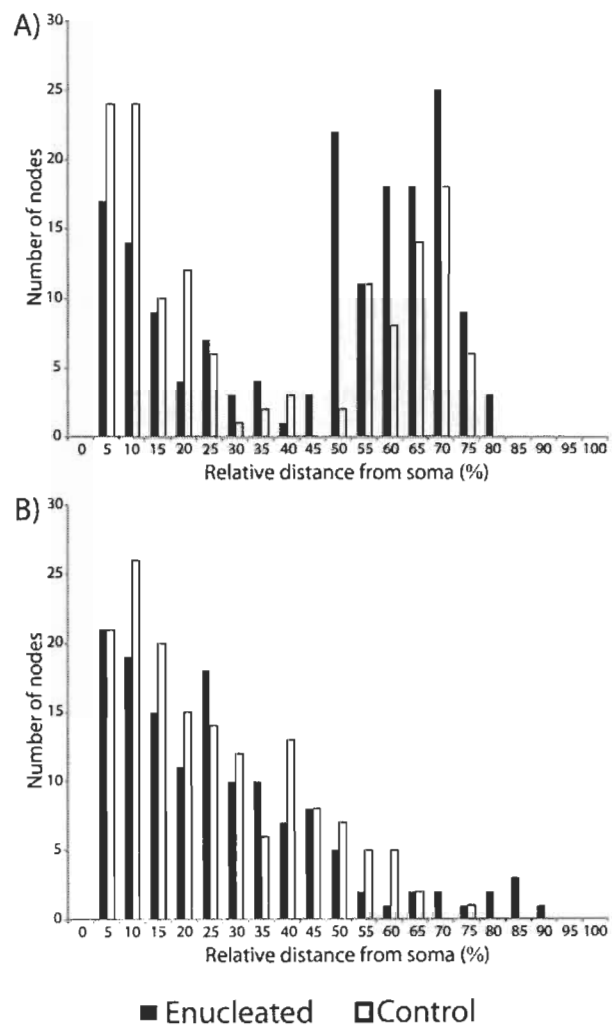
Figure 5

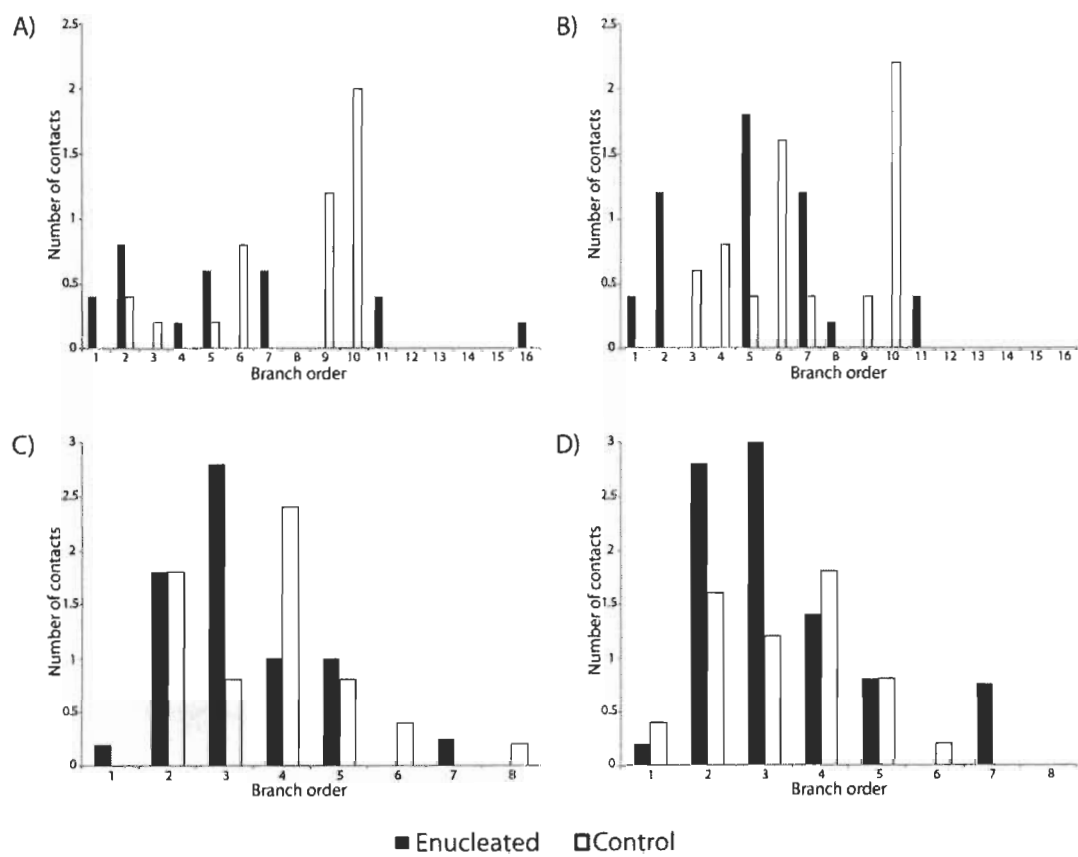
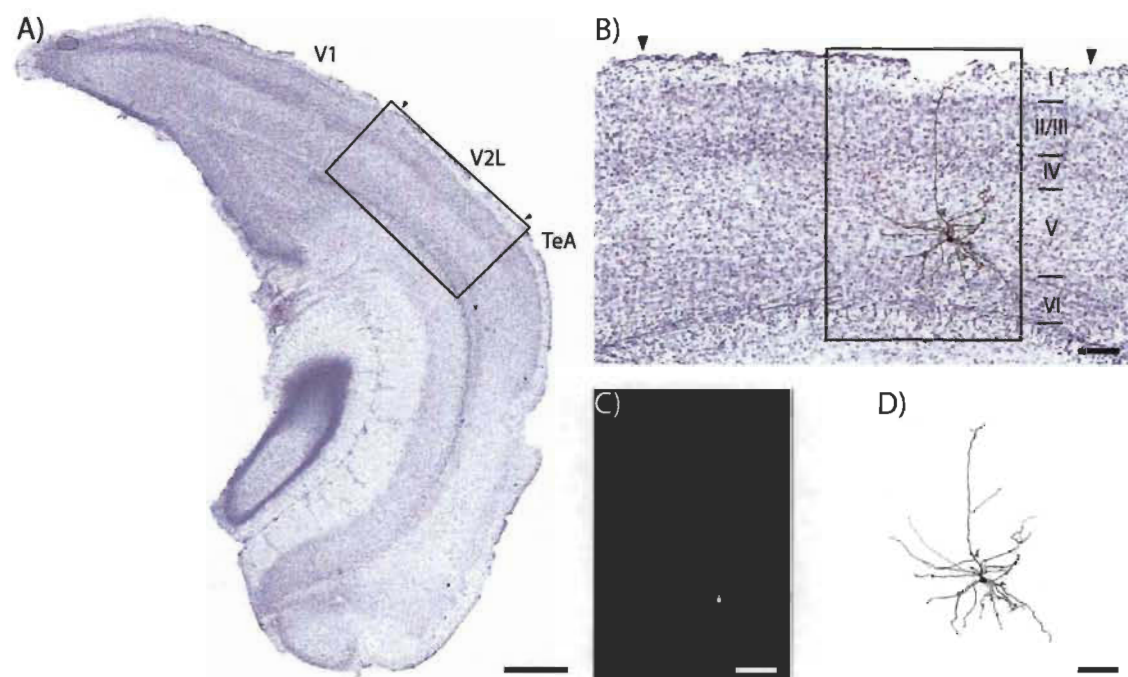
Figure 6

Figure 7

CHAPITRE V

PRINCIPAL COMPONENT AND CLUSTER ANALYSIS OF LAYER V PYRAMIDAL CELLS IN VISUAL AND NON-VISUAL CORTICAL AREAS PROJECTING TO THE PRIMARY VISUAL CORTEX OF THE MOUSE

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en 2012 dans la revue
Cerebral Cortex: Laramée, M.E., Rockland, K.S., Prince, S., Bronchti, G. et Boire, D.

Résumé

Les connexions cortico-corticales de longue distance entre les aires visuelles et non-visuelles qui proviennent de neurones pyramidaux de la couche 5 peuvent être considérées comme une sous-population de connexions *feedback*. Le but de cette étude est de déterminer si les neurones pyramidaux de la couche 5 des aires sensorielles visuelles et non-visuelles qui projettent vers le cortex visuel primaire (V1) constituent une population cellulaire homogène. De plus, nous allons vérifier si l'arborisation dendritique est associée à la cible, la modalité sensorielle, le niveau hiérarchique ou la latéralité de l'aire corticale d'origine. Des reconstructions tridimensionnelles complètes de l'arborisation dendritique de neurones pyramidaux de la couche 5 rétrogradement marqués ont été effectuées. Ces neurones proviennent des cortex primaires auditif et somesthésique, ainsi que des cortex visuels secondaires latéral et médial, des deux hémisphères. Les paramètres morphologiques qui ont été extraits de ces reconstructions ont été utilisés pour effectuer une analyse des composantes principales (PCA) et une analyse de groupement. La PCA a montré que les neurones possèdent un éventail de morphologies et qu'ils ne forment pas de groupes distincts. Néanmoins, l'analyse de groupement a défini des groupes de neurones qui partagent des propriétés morphologiques similaires. Chaque aire corticale possède des neurones qui proviennent de plus d'un groupe. Nous proposons que les connexions *feedback* de la couche 5 d'une aire corticale comprennent des neurones possédant différents types morphologiques.

Mots-clés : dendrites, cortico-corticales extrastrées, *feedback*, multisensoriel, traceur rétrograde adénoviral

Principal component and cluster analysis of layer V pyramidal cells in visual and non-visual cortical areas projecting to the primary visual cortex of the mouse

Marie-Eve Laramée¹, Kathleen S. Rockland^{2,3}, Stéphanie Prince¹, Gilles Bronchti¹ et Denis Boire^{1,4}

1. Groupe de Recherche en Neurosciences, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
2. RIKEN-MIT Center for Neural Circuit Genetics, MIT Cambridge, MA, USA, 02116
3. Lab for cortical organization and systematics, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-Shi, Saitama, 351-0198, Japon
4. École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3T 1P1

Abstract

The long-distance corticocortical connections between visual and non-visual sensory areas that arise from pyramidal neurons located within layer V can be considered as a subpopulation of feedback connections. The purpose of the present study is to determine if layer V pyramidal neurons from visual and non-visual sensory cortical areas that project onto the visual cortex (V1) constitute a homogeneous population of cells. Additionally, we ask whether dendritic arborization relates to the target, the sensory modality, the hierarchical level or laterality of the source cortical area. Complete 3-dimensional reconstructions of dendritic arbors of retrogradely labeled layer V pyramidal neurons were performed for neurons of the primary auditory (A1) and somatosensory (S1) cortices and from the lateral (V2L) and medial (V2M) parts of the secondary visual cortices of both hemispheres. The morphological parameters extracted from these reconstructions were subjected to principal component (PCA) and cluster analyses. The PCA showed that neurons are distributed within a continuous range of morphologies and do not form discrete groups. Nevertheless, the cluster analysis defines neuronal groups that share similar features. Each cortical area includes neurons belonging to several clusters. We suggest that layer V feedback connections within a single cortical area comprise several cell types.

Keywords: dendrites, extrastriate corticocortical, feedback, multisensory, retrograde adenovirus

Introduction

Layer V pyramidal neurons are recognizable by their basic morphology, which consists of a pyramid shaped soma, an apical dendrite extending towards the pial surface and a basal skirt (De Felipe and Farinas 1992). Layer V pyramidal neurons exhibit a range of dendritic morphologies, even within a single cortical area, as previously shown in the mouse (Tsiola et al. 2003). The dendritic arborization of these neurons appears to be related to their connections and by the cortical area to which they belong. For instance, in monkeys, it was shown that callosal projection neurons possess longer apical and basal dendrites and more dendritic spines than ipsilaterally projecting neurons (Soloway et al. 2002), and that the complexity of the dendritic tree increases with the hierarchical level of cortical areas of a same sensory modality (Elston and Rosa 2000). In the mouse, it was furthermore demonstrated that dendritic arbors are simpler in the visual cortex than in the somatosensory cortex (Benavides-Piccione et al. 2006; Groh et al. 2010),

The length of the apical dendrite is often used to classify layer V pyramidal neurons in three morphological groups: tall-tufted, tall-simple and short (Larsen and Callaway 2006). These three subtypes of pyramidal neurons are associated with specific electrophysiological properties and connectivity. In the neocortex, tall-tufted pyramidal neurons, also known as thick, tufted or type I, are intrinsically bursting cells, whereas tall-simple and short neurons, also called slender or type II, are mostly regular spiking (Chagnac-Amitai et al. 1990; Hattox and Nelson 2007; Kasper et al. 1994; Mason and Larkman 1990). While tall-tufted neurons are involved in corticofugal connections, tall-simple and short neurons participate in corticocortical connections (Games and Winer 1988; Hallman et al. 1988; Hubener and Bolz 1988; Hubener et al. 1990; Kasper et al. 1994; Larsen et al. 2007; Schofield et al. 1987).

Feedback corticocortical connections are not a homogeneous population (Rockland 2004). Although, they mostly arise from infragranular layers, some neurons from supragranular layers are also involved (Felleman and Van Essen 1991; Rockland and Pandya 1979). The relative contribution of supragranular and infragranular neurons to corticocortical connections is related to the hierarchical distance between two connected

cortical areas (Barone et al. 2000; Reid et al. 2009; Vezoli et al. 2004). For two equivalent hierarchical levels, retrogradely labeled neurons will be equally distributed in infragranular and supragranular layers. When neurons of origin are almost exclusively restricted to infragranular layers, the cortical area of origin has been assigned to a higher hierarchical level than the other one (Felleman and Van Essen 1991). Furthermore, layer V appears to strongly contribute to long-distance feedback connections in the mouse, although many feedback neurons are also located within layer VI (Bai et al. 2004) (Charbonneau et al. manuscript submitted). Finally, because several subtypes of layer V pyramidal neurons have been described (Molnár and Cheung 2006), one can predict the existence of several types of feedback connections originating from this layer. So far, the existence of subtypes of layer V pyramidal neurons has not been taken into account to study the organization of feedback corticocortical connections.

As mentioned above, the complexity of the apical dendrite has been the main morphological criterion to classify layer V pyramidal neurons. With this approach, two main groups have been described: (1) tall-tufted and (2) tall-simple and short. However, this parameter alone does not account for the structural complexity of the entire dendritic arborization. The developmental pattern of layer V pyramidal neurons strongly suggests that there are likely four separate functional dendritic compartments namely the basal dendrite, apical trunk, oblique dendrite and tuft dendrite (Romand et al. 2011). Therefore, the use of several dendritic morphological parameters, pertaining to the apical, oblique and basal dendrites, may provide a more comprehensive analysis and promote successful classification of layer V pyramidal neurons. Mathematical tools that ordinate objects in multidimensional space, such as the principal component analysis (PCA) and that objectively group similar objects using multiple descriptors such as cluster analysis, are appropriate for this approach. These analyses have previously been used to demonstrate the existence of distinct subgroups of layer II/III (Benavides-Piccione et al. 2006), V (Tsiola et al. 2003) and VI (Chen et al. 2009) neurons in the mouse cerebral cortex.

In this study, we document the organization of the subgroup of corticocortical feedback connections in layer V, using as comparison the morphological properties of commissural and non-commissural layer V pyramidal neurons that project onto the primary visual cortex (V1) from the primary auditory (A1) and somatosensory (S1) cortices and from the lateral (V2L) and medial (V2M) parts of the secondary visual cortex. If sensory modality, hierarchy and laterality influence the morphology of the dendritic arborization, we would predict several subgroups of pyramidal neurons, with the implication of several types of feedback connections. If, however, determining factors for the dendritic arborization are associated with specific connectivity and functional properties, layer V pyramidal neurons that project onto V1 are more likely to be morphologically similar.

Methods

All experiments were carried out in level 2 biosafety facilities in accordance with National Institutes of Health (NIH) Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules and Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 80-23).

Injections and tissue processing

To study the morphology of the entire dendritic arbors of individual layer V pyramidal neurons in A1, S1, V2M and V2L that project onto V1, we injected an adenovirus that expresses EGFP under a synapsin promoter (AdSynEGFP) in V1 in C57BL/6 mice. With this technique, a Golgi-like retrograde labeling of complete dendritic arbors was achieved (Fuentealba et al. 2008; Ichinohe et al. 2008; Laramée et al. 2011; Papp et al. 2011; Tomioka and Rockland 2006).

Seven C57BL/6 mice (90-120 days) were used for this study. They were anesthetized using a solution of chloral hydrate (400mg/kg body weight). When a surgical level of anesthesia was achieved, a small opening in the skull and dura was performed and 0.5 μ L

of AdSynEGFP (1.5×10^{12} pfu/ml) was pressure injected in V1 (3.8mm posterior and 2.6mm lateral to Bregma) at a depth of 600 μ m. All injections were performed at a rate of 0.06 μ l/min through a 30 μ m tip glass pipette glued onto a Hamilton syringe. After the surgery, animals were returned to their nest for recovery. Fourteen days later, they were anesthetized with urethane (1.5mg/kg body weight) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffer (PB) at pH 7.4. The brains were harvested, post-fixed in 4% PFA solution for 2-3h and placed for 24h in a 30% sucrose solution for cryoprotection. The next day, they were frozen and cut in 50 μ m coronal serial sections with a freezing microtome. Sections were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 and blocked in a 5% normal goat serum (NGS) with 0.5% Triton-X-100 and 0.1M PBS (PBS-TX) for 2h. They were afterwards placed in the primary antibody solution of 0.5 μ g/ml of rabbit anti-GFP antibody (Tomioka and Rockland 2006), overnight at room temperature. After a wash in PBS, sections were incubated in the biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody solution (Vector Labs; 1:200) for 2h. After washes in PB, they were placed in an ABC solution (Vector Labs; 1:200) for another 2h and then reacted with 3-3'-diaminobenzidine and intensified with Nickel-ammonium sulfate. Finally, sections were washed in PB and mounted on gelatinized slides, dehydrated, and counterstained with cresyl violet before being cover-slipped.

Validation of injection sites

All injection sites in V1 were validated with reference to cortical areal cytoarchitecture (Caviness, Jr. 1975). AdSynEGFP injections were required to be limited to V1 and to label all cortical layers without encroaching on to the subcortical white matter (Fig. 1A). Retrograde labeling in the lateral geniculate nucleus was also required to validate the localization of injection sites. Five of the seven injected mice met these criteria and were used for this study.

Selection of neurons

A total of 63 neurons were selected from the five mice with validated AdSynEGFP injections in V1 (Table 1). Layer V pyramidal neurons were selected for further analysis, if they were sufficiently well isolated to allow complete 3D reconstruction of the dendritic arbor. Localization of pyramidal cells was based on cytoarchitectonic features of the cortical area to which they belong (Caviness, Jr. 1975). The number of neurons reconstructed in each mouse is depicted in Table 2.

3D reconstruction

All neurons were reconstructed under a 100X objective (oil immersion objective, 1.4 NA) using an Olympus BX51W1 microscope coupled to CCD digital camera and customized with the NeuroLucida software (MicroBrightField Bioscience). All neurons were reconstructed from a complete set of serial sections. To ensure completeness of reconstructions, all dendrites were required to be continued onto adjacent sections until a round ending was found, or until it was impossible to find the continuation of the branch onto the next section. Because of the tissue processing, all sections shrunk to an average thickness of 20 μ m, which correspond to a reduction of 2.5 times of the original section thickness. Therefore, after the dendritic arborization was completely reconstructed, a shrinkage correction of 2.5 in the z-plane was applied to the tracing using the shrinkage correction tool from the NeuroLucida software. No correction was applied for the x and y planes. The analyzed morphological parameters (25) were all available in NeuroLucida Explorer (MicroBrightField Bioscience) (Table 3).

Computer-assisted analysis

A total of 25 morphological parameters have been analyzed and used to compare 63 layer V pyramidal neurons from 10 different cortical areas. An objective computer-assisted method was required to compare all reconstructed neurons and to group them based on their most significant morphological features. Therefore, as in previous studies

performed in the mouse (Benavides-Piccione et al. 2006; Chen et al. 2009; Tsiola et al. 2003), PCA and cluster analysis were used.

Principal component analysis (PCA)

We were interested here in showing the dispersion of neurons as described by their entire dendroarchitecture. This can best be achieved by gathering a host of morphological parameters or descriptors on each object, in this case, neurons. Examining scatterplots of the dispersion of these objects with respect to all possible pairs of descriptors is neither efficient nor informative of the whole body of available data. Therefore, PCA was used to visualize the distribution of cells in multivariate space. In order to decide how many components should be maintained for further analysis, we chose the Kaiser-Gutman criterion that states that one should interpret only those components with an eigenvalue larger than the mean eigenvalues. When PCA is performed on the correlation matrix, the average of the eigenvalues being 1, only the components whose eigenvalues are larger than 1 should be interpreted (Legendre and Legendre 1998). Therefore, from all available principal components (PCs), only those with a loading equal to or greater than 1 were selected for further analysis. A principal component analysis is more influenced by parameters that have high absolute values, such as the apical dendrite length, and less so by small absolute values, such as the number of oblique dendrites. Therefore, each morphological parameter was normalized using logarithmic or square root transformations, depending on which of these resulted in the best Gaussian distribution. The choice of the significant PCs was confirmed with the scree plot of all PCs, also available with the PCA. These significant PCs were afterward used to produce a scatterplot matrix, to observe the distribution of each neuron in the multidimensional space. Finally, using the absolute loadings of each variable for every PCs, the morphological parameters that had a loading equal to or greater than 0.70 in at least one PC were selected for further analysis (in bold in Table 3).

Cluster analysis

This technique groups neurons that are sufficiently similar to each other in a multidimensional space, according to the selected clustering method. Here, Ward's method with squared Euclidean distance was used to classify neurons so that each group has a minimal variance. Following this analysis, the frequency distribution of cell types was compared between cortical areas in order to determine whether each cortical area comprises similar populations of neurons using a Chi-square analysis (SPSS version 16.0).

Sholl analysis

The Sholl analysis provides a synthetic representation of the distance of dendrites and spines, from the soma. The Neurolucida Explorer (MicroBrightField Bioscience) software was used to perform this analysis. The distance between each radius was set to 30 μ m and the starting point was located at the cell body. Apical and basal dendrites were analyzed separately. The apical dendrite includes the apical trunk, oblique dendrites and the apical tuft. The total dendritic length and spine number were directly obtained from the analysis and spine density was calculated by dividing the number of spines per 30 μ m radius over the total dendritic length within that radius. The spine density was expressed as the number of spines per 10 μ m.

Statistical analysis

A one-way ANOVA was used to compare groups obtained with the cluster analysis. This was performed in an attempt to understand the classification of the neuronal population on the basis of their dendritic arbors. Although it could be considered inappropriate to perform between-group ANOVA comparisons because the same sum of squares are calculated in the cluster analysis (Chen et al. 2009), this analysis was performed only to identify which morphological parameters significantly differ between the cluster defined groups. A one-way ANOVA was also used to compare the distribution of dendritic spines between commissural and non-commissural neurons. In

order to have more stringent statistical conclusions, all statistical analyses were performed with a significance level of $p < 0.01$ using SPSS 16.0 software for Windows.

Results

Injection site and retrograde labeling

To be considered for further analysis, AdSynEGFP injections in V1 had to be large enough to label all cortical layers without encroaching on the subcortical white matter, and be limited to V1 (Fig. 1A). From the seven mice that received injections, five met these criteria; the injections were located at the V2M/V1 border in the other two mice. AdSynEGFP injections resulted in a high resolution Golgi-like labeling of the dendritic arbors (Fig. 1B) and dendritic spines (Fig. 1C), confirming the efficacy of this viral tracer for complete 3D reconstructions (Fuentealba et al. 2008; Ichinohe et al. 2008; Laramée et al. 2011; Papp et al. 2011; Tomioka and Rockland 2006) and quantification of spines (Ichinohe et al. 2008; Laramée et al. 2011).

Retrogradely labeled neurons were mainly located in infragranular layers, mostly layer V, and only neurons from this layer were reconstructed. In all five mice, retrogradely labeled neurons were found in many sensory and non-sensory cortical areas, such as medial and lateral secondary visual areas, primary and secondary auditory cortices, primary and secondary somatosensory cortices, motor areas, frontal areas, cingulate cortex, retrosplenial cortex, temporal and posterior parietal associative areas. This pattern of retrograde labeling after injection in V1 is consistent with previous studies in rat (Miller and Vogt 1984) and mice (Charbonneau et al. manuscript submitted). Furthermore, two clusters of neurons were observed within V2L: one in the anterior part and one in the posterior part of this cortical area (Figure 2). These neurons were therefore analysed separately, as V2Lant and V2Lpost, because they might represent two different extrastriate visual areas, namely the anterolateral (AL) and lateromedial (LM) areas, (Coogan and Burkhalter 1993; Olavarria and Montero 1989; Wang and Burkhalter 2007) that are involved in distinct sensory processes (Wang et al. 2011).

Various morphologies were qualitatively observed. Some neurons had a highly arborized apical tuft within layer I, whereas other had a slim tuft that only reached layers II/III (see Fig.4, cells #43 versus #28). There were neurons with oblique dendrites distributed along the length of the apical trunk (see Fig. 4, cell #29 and #34), whereas others had highly ramified oblique dendrites originating from its base (see Fig. 4, cell #43 and Fig. 5). Basal dendrites were, for the most part, restricted to layer V, but they were highly arborized in some neurons and very sparse in others (see Fig.4, cells #43 versus #21). Because of this diverse range of morphologies, it was almost impossible to compare the neurons from V2Lant, V2Lpost, V2M, A1 and S1 that project onto V1 based on qualitative observations only. It was thus necessary to use unbiased quantitative measurements, such as the length of the apical dendrite, principal component analysis, cluster analysis and Sholl analysis, to perform an objective classification.

Morphological types

As in Larsen and Callaway (2006), the total length of the apical dendrite, excluding the oblique dendrites, was used to classify neurons as short (less than 1.5mm), tall-simple (1.5mm to 3.3mm) and tall-tufted (more than 3.3mm). Using these classification criteria, only tall-simple (12.70%) and short (87.30%) neurons were found to participate in these feedback corticocortical connections onto V1.

Principal component analysis (PCA)

A total of 25 PCs were extracted. Among them, the first six had an eigenvalue equal to or greater than 1, and accounted for 86.20% of the total variance (Table 3). A scree plot was also used to confirm that, after the sixth PC, a plateau was reached, meaning that the remaining PCs did not significantly add to the variance. The loading of each variable was obtained for these six PCs and only the ones with an absolute value equal to or greater than 0.70 were kept for all subsequent analyses (in bold in Table 3). These thirteen parameters are the ones that accounted for the highest degree of variance in the

population of reconstructed neurons and can be considered the most suitable as a basis for classification.

A scatterplot matrix was extracted to represent all neurons in a three dimension space using these parameters and the first three components, which account for 65.59% of the total variance (Fig. 3). No isolated clusters of neurons were observed and all neurons were intermingled regardless of the hemisphere, the sensory modality or the hierarchical rank of the cortical area they belong to. The first PC accounts for 30.25% of the total variance and that the second and third PCs account for 20.55% and 14.79%, respectively.

In an attempt to evaluate the diversity of morphologies found in the population, neurons were represented in the order of their increasing score in the first PC (Fig. 4). The factors most contributing to the first PC are the volumes of the oblique dendrites (0.84), of the apical dendrite (0.82) and of the basal dendrites (0.73). This is evident when the first (cell #21) and last (cell #43) neurons are compared. The first is devoid of oblique dendrites, has a tiny apical tuft and very few basal dendrites. The last one, however, has many oblique dendrites that originate from the base of the apical trunk and arborize extensively within layer V, in an area mostly occupied by basal dendrites (Fig. 5). This neuron also possesses an apical tuft and basal dendrites that are highly ramified. In agreement with the contributing factors of the first PC, this classification of the neuronal population displays the increase in the complexity of the oblique, basal and apical dendrites.

Cluster analysis

A cluster analysis based on the Ward's method, which forms groups that have the smallest degree of variance, was performed (Fig. 6). Six groups were obtained. The first partition of neurons appears to be determined by significant differences in the number of dendritic spines onto the basal dendrites ($P < 0.001$), the volume of the basal dendrites ($P < 0.001$), the number of dendritic spines onto the apical trunk ($P < 0.001$), the total

length of the apical trunk ($P = 0.010$), the volume of the apical trunk ($P < 0.001$), the number of dendritic spines onto the oblique dendrites ($P < 0.001$) and the volume of the oblique dendrites ($P < 0.001$). All of these parameters were significantly higher in the second subdivision which comprises groups 5 and 6.

The next subdivision resulted in three groups: 1-2, 3-4, 5-6. When these groups were compared, only morphological parameters involving the basal dendrites revealed significant differences. Indeed, groups 1-2 and 3-4 differed by the number of endings ($P = 0.009$), the number of spines ($P < 0.001$) and the volume of these dendrites ($P < 0.001$).

The third and last subdivision resulted in the six individual groups. Groups 1 and 2 were highly heterogeneous and no categorization could be found. Groups 3 and 4, however, were distinguished by the number of endings ($P < 0.001$) and spines ($P = 0.001$) onto their apical trunk, the total length of the apical trunk ($P < 0.001$), the number of endings onto the apical tuft ($P = 0.001$) and the length of the apical tuft ($P < 0.001$). Groups 5 and 6 differed by the number of spines ($P < 0.001$).

The different clusters that were obtained do not partition in any way that would correspond to the cortical area in which the neurons are located. Groups 1 and 2 were highly heterogeneous in this respect. This was not the case for the comparison of groups 3 and 4, and 5 and 6. Indeed, in group 4, neurons belonged mainly to primary sensory areas (5/7, 71.43%), whereas group 3 was equally represented by neurons from primary (5/12, 41.67%) and secondary cortical areas. Within groups 5-6, callosal neurons were frequent (16/22, 72.72%), whereas they only account for 36.58% (15/41) of the population from groups 1-2-3-4. Moreover, groups 5 and 6 were differently represented in term of neurons from primary and secondary cortical areas: only 55.56% (5/9) of the neurons from group 5 were from a secondary visual area, whereas 76.92% (10/13) of the neurons found in group 6 came from V2L or V2M.

When the frequency distribution of neurons of the clusters 1-2, 3-4, and 5-6 between cortical areas are compared (Table 4) it is seen that almost all cortical areas include neurons belonging to each cluster. However, neurons from cluster 5-6 are absent in the ipsilateral V2Lant and V2Lpost, whereas these areas contain cells from clusters 1-2 and 3-4. The contralateral V2Lpost comprises only cells from clusters 5-6 and V2M also comprises a greater proportion of neurons from these clusters. Indeed, there is a significant difference in the frequency distribution of cells of clusters 1-2, 3-4 and 5-6 across cortical areas ($\chi^2=31.84$, $P=0.02$, $df=18$). This statistical difference is no longer present when the neurons from ipsilateral V2Lant are removed from the analysis ($\chi^2=23.77$, $P=0.09$, $df=16$). Similarly this difference did not reach levels of significance when neurons from the contralateral ($\chi^2=20.31$, $P=0.21$, $df=16$) or ipsilateral ($\chi^2=25.90$, $P=0.06$, $df=16$) V2Lpost were removed from the analysis. This demonstrates 1) that cortical areas contain subsets of pyramidal neurons in layer V that project to the primary visual cortex that have significantly different dendritic morphologies, and 2) that each cortical area can contain different populations of these neurons.

Sholl analysis

The spatial organization of the dendritic arbors was also compared between commissural and non-commissural projecting neurons for all cortical areas. The total dendritic length, spine number and spine density were obtained for basal (Fig. 7) and apical (Supplementary Fig. 1) dendrites, using the Sholl analysis. For almost all neurons, the basal dendrites are contained in 210 μ m spheres. In V2Lpost, however, there are two neurons that possess long basal dendrites that extend as far as 450 μ m from the cell body. In all cortical areas, neurons have the highest total dendritic length, ranging from 588.7 μ m to 1905.8 μ m (both in contralateral S1), around the 90 μ m bin, and there are neurons with short and long dendrites, which suggest heterogeneity of basal dendritic arbors. The same is also true for the spine number. Some neurons possess up to 617 spines (contralateral S1), whereas others have as few as 60 spines (ipsilateral A1). A high heterogeneity was also found when the spine density was compared. In all cortical areas, the spine density ranges between 1 and 4 spines/10 μ m. Finally, when the same

analysis is performed over the apical dendrite, several apical morphologies are also found (see Supplementary Fig. 1).

Spine distribution

The laminar distribution of spines was also compared between ipsilaterally and contralaterally projecting neurons because it will affect the type of inputs a neuron receives. Their distribution onto the apical trunk, apical tuft, oblique dendrites and basal dendrites was analyzed with respect to cortical layers (Fig. 8). Only neurons in the contralateral V2Lant had a greater number of dendritic spines, distributed on basal dendrites within layer V ($P = 0.006$).

Discussion

In three mice, all retrogradely labeled neurons were charted in cortical areas V2L, V2M, A1 and S1 and other non-sensory areas. Direct heteromodal corticocortical connections onto V1 have already been reported in macaque (Borra and Rockland 2011; Clavagnier et al. 2004; Falchier et al. 2002; Rockland and Ojima 2003), cat (Hall and Lomber 2008; Innocenti et al. 1988; Sanchez-Vives et al. 2006), mice (Larsen et al. 2009) and prairie vole (Campi et al. 2010). As in previous studies, the laminar distribution of retrogradely labeled neurons found here, namely in the supragranular and, more frequently, infragranular layers, suggests that these connections are of the feedback type (Charbonneau et al. manuscript submitted). In primates, feedback corticocortical connections originate from supragranular and infragranular neurons with a clear predominance of infragranular neurons located in layer VI (Clavagnier et al. 2004; Falchier et al. 2002; Felleman and Van Essen 1991; Rockland 2004; Rockland and Pandya 1979). In rodents a similar pattern is shown but infragranular neurons are located in both layer V and VI (Bai et al. 2004; Budinger et al. 2006). These projections neurons are numerous in both layers.

Layer V pyramidal cell subtypes

Larsen and Callaway (2006) used the morphology and length of the apical dendrite to classify mouse layer V pyramidal neurons in three neuronal groups: short neurons have apical dendrites shorter than 1.5mm, tall-simple neurons have apical dendrites length ranging from 1.5mm to 3.3mm and tall-tufted neurons have apical dendrites longer than 3.3mm. Using these criteria, only tall-simple and short neurons were shown to contribute to corticocortical connections onto V1. This is consistent with previous studies that used the length of the apical dendrite (Games and Winer 1988; Hallman et al. 1988; Hubener and Bolz 1988; Hubener et al. 1990; Kasper et al. 1994; Larsen et al. 2007) or the ratio of the total length of the apical dendrite over the total length of the basal dendrites (Groh et al. 2010) to classify pyramidal neurons. Tall-simple and short neurons are recognized as regular spiking (Chagnac-Amitai et al. 1990; Hattox and Nelson 2007; Kasper et al. 1994; Mason and Larkman 1990) and their projections are usually directed towards other cortical areas. In contrast, tall-tufted neurons send axon collaterals onto several subcortical structures, such as the thalamus and superior colliculus (Games and Winer 1988; Hallman et al. 1988; Hubener and Bolz 1988; Hubener et al. 1990; Kasper et al. 1994; Larsen et al. 2007; Schofield et al. 1987). All reconstructed neurons that project to V1 were tall-simple or short. Our results therefore suggest that feedback corticocortical connections onto V1 from several cortical areas are functionally similar, on the basis of the electrophysiological properties and connection specificity.

Most of the reconstructed neurons exhibited a slender apical tuft that extended throughout superficial layers in addition to several basal dendrites. These morphological properties indicate that the reconstructed neurons belong to the subgroup 1B of layer V pyramidal neurons (Tsiola et al. 2003). This is consistent with what has been found in V1 and S1, where neurons involved in corticocortical connections also belong to subgroup 1B (Groh et al. 2010). However, we cannot rule out the possibility that the neurons in layer V found to project to area V1 may further differentiate into several subtypes defined by different protein expression patterns (Molnár and Cheung 2006). The qualitative observations presented here further suggest that the structure and distribution of basal and oblique dendrites might also be relevant in assessing the

diversity of layer V pyramidal neurons. This is consistent with the observation that layer V pyramidal cells that express the Kv3.1 potassium channel have more numerous oblique dendrites than those that do not express this receptor (Akemann et al. 2004).

Principal component analysis (PCA)

The PCA was used because it allows for a multidimensional representation of the neuronal population based on the most relevant features of their dendritic arborization. To our knowledge, the representation of the distribution of layer V pyramidal neurons in a multidimensional space, using the PCA, has never been performed before. This technique has, however, been used to represent the distribution of layer II/III neurons from V2 and the secondary somatosensory (S2) and motor (M2) cortical areas in the mouse (Benavides-Piccione et al. 2006). The authors showed that neurons from each of these cortical areas form distinct groups. Also, the PCA was used to successfully sort granule cells, interneurons, CA1 pyramidal neurons and CA3 pyramidal neurons in individual groups in the hippocampus of the rat (Cannon et al. 1999). Altogether, these results suggest that the PCA is a powerful technique to classify neurons using their most relevant morphological features.

Twenty-five morphological parameters were analyzed after complete 3D reconstructions of dendritic arbors. Among them, 13 significantly accounted for the variance in our neuronal population. The PCA-based distribution of neurons in multidimensional space resulted in an aggregated scatter plot slightly more elongated in the first PC that accounts for 30% of the total variance with only a few outlying cases. It is noteworthy that no isolated groups were found. When neurons are ordinated along their increasing score in the first PC, mainly influenced by the volume of the oblique, apical and basal dendrites, it is apparent that the lowest scoring neurons were simple and the highest scoring ones more complex. Such a continuum could emerge from the developmental mechanisms that shape dendritic arbors of cortical neurons. For example, in layer IV, spiny stellate cells start as pyramidal cells; their apical dendrite shrinks and basal dendrites expand in their final morphology (Callaway and Borrell 2011). Early visual

deprivation increases the number of pyramidal cells at the expense of stellate cells, indicating that the remodeling of dendrites is experience-dependent (Callaway and Borrell 2011; and see Koester and O'Leary 1992 for callosal and corticotectal neurons, and Romand et al. 2011 for changes in somatosensory tall-tufted neurons).

The volume and the number of spines of the apical, basal, and oblique dendrites are the main factors involved in the differentiation of the neurons sampled here and appear in the first principal component. In addition, contrary to layer IV spiny stellate neurons in which growth of apical and basal dendrites appear to be inversely correlated, in our sample, they appear to be strongly correlated as show by their positive loadings in the first principal component (see Table 3). This pattern is similar to the development of tall-tufted layer V pyramidal neurons of the somatosensory cortex in that, very early in development, there is a rapid growth of all dendritic compartments. Later development is characterized by an increase in the number of basal dendritic segments (Romand et al. 2011). The factors with the highest loadings in the three first principal components are thus quite similar to those that are involved in the developmental shaping of dendritic arbors and reflect the strong influence of general growth of the dendritic arbor, multiplication and pruning of endings and rapid increase in the number of spines.

Cluster analysis

The cluster analysis is the most common technique to classify neuronal populations. Layer V pyramidal neurons (Tsiola et al. 2003) and neurons from layer VI (Chen et al. 2009) have been sorted in several groups and subgroups. Computer-generated neurons from each cortical layer were also separated in distinct groups (Heumann and Wittum 2009). In addition to the length and complexity of the apical dendrite, the present study includes oblique and basal dendrites in the analysis. This resulted in clusters that do not follow the tall-simple and short neuron dichotomy, and may be evidence for finer layer V pyramidal classifications. Protein and gene expression were not considered here but undoubtedly can be useful in refining the classification of neurons (Molnár and Cheung 2006).

Antibodies against latexin have identified subpopulations of pyramidal neurons. In that a small subpopulation of the many retrogradely labeled layer V neurons were latexin+ (Bai et al. 2004). Similar results are shown in A2 and S2 following retrograde tracer injections in A1 and S1, respectively (Bai et al. 2004). This clearly demonstrates that feedback projecting pyramidal cells comprise at least two subpopulations, from the perspective of latexin expression. Whether this dichotomy corresponds to the tall-simple and short classification of neurons is not known. More importantly, the proportion of latexin+ feedback projecting neurons is different between cortical areas. For layer VI, which has greater number of latexin+ retrogradely labeled cells, the percentage of double-labeled neurons varies between 56% in V2L to 88% in S2. It is noteworthy that latexin does not appear to label a significant number of layer V feedforward projection neurons (Bai et al. 2004)

In addition to the PCA, we performed a cluster analysis to determine whether layer V pyramidal neurons that project onto V1 form groups that would correspond to cortical area, laterality or sensory modality. Six groups were obtained; none of them was formed by neurons observing only one of these criteria. Even if the first division of the cluster resulted in two main groups differently represented by commissural and non-commissural neurons, these groups were not homogeneous. We thus cannot conclude that laterality, sensory modality or cortical area is sufficient to classify layer V pyramidal neurons that project onto V1. What does appear is that in each cortical area, the population of neurons projecting to V1 comprises morphologically diverse neurons.

The basal dendrites of the reconstructed neurons exhibit a range of morphologies within each cortical area. To our knowledge, there are no studies demonstrating an increase in the complexity of the dendritic arbors from low to high order cortical areas in the mouse and our results also do not seem to support this idea. These results are at odds with observations in agouti (Elston et al. 2006), monkeys (Elston and Rosa 1997; Elston et al. 1999b) and humans (Jacobs et al. 1997; Jacobs et al. 2001), showing that the population of layer II/III pyramidal neurons is homogeneous with respect to the basal dendrite morphologically within a given cortical area. This suggests that more complex neurons

are still intermingled with simple neurons in mice, as the parcellation of their neocortex might not be as advanced as in primates (Krubitzer 1995).

It is possible that layer V pyramidal neurons that project onto V1 in the mouse are a more homogeneous subgroup of the overall neuronal population in this layer. In monkeys, the complexity of dendritic arbors of retrogradely labeled neurons within the visual system is correlated with the hierarchy of the cortical area (Elston and Rosa 2006). In cats, intermediate segments of neurons projecting onto visual areas from the V1/V2 border are significantly longer than those from neurons in V1 (Vercelli and Innocenti 1993). Here, reconstructed neurons are from visual, auditory and somatosensory areas and are thus involved in heteromodal corticocortical connections. The correlation between complexity of dendritic arbors and hierarchy might hold true only within a single sensory modality and dramatically so in non-rodent species (Charbonneau et al. manuscript submitted). Thus, it might not be surprising that the reconstructed neurons cannot be grouped on the basis of the cortical area or hierarchy.

Our results are in agreement with other studies demonstrating evidence of heterogeneous populations of neurons projecting to a single target. For example, there are significant differences in gene expression between supra and infra-granular layer callosal projection neurons, and there are combinations of genes that demonstrate subpopulations of callosal projection neurons within individual cortical layers. Furthermore, there is a greater molecular heterogeneity of supragranular than infragranular callosal projection neurons. The molecular dissection of these neuronal subpopulations reveals a greater diversity than was recognized using anatomical criteria (Fame et al. 2011; Molyneaux et al. 2009).

Spine distribution

The contralateral V2Lpost comprises a greater proportion of neurons belonging to clusters 5-6. This cluster emerges at the first partition and differs from clusters 1-4 in several parameters. In particular, this subdivision of the cluster analysis appeared to be explained by the number of dendritic spines found on the basal dendrites, apical trunk and oblique dendrites. Because the first group (cluster 1-4) was mainly represented by non-commissural neurons and the second group (cluster 5-6) by commissural neurons, the distribution of spines was compared for all cortical areas with respect to the hemisphere. Only neurons from V2Lant had significantly more dendritic spines onto the basal dendrites.

In V2L, neurons appeared to form two distinct patches, one anterior and one posterior, identified as V2Lant and V2Lpost, respectively. The V2Lant and V2Lpost patches seem to correspond to AL and LM extrastriate visual areas, respectively. These two areas are involved in distinct pathways: LM is part of the ventral stream and AL of the dorsal stream (Wang et al. 2011). In the marmoset, dendritic arbors of layer II/III pyramidal neurons from the ventral stream have significantly larger dendritic fields, higher spine number and densities and larger cell bodies compared to those from the dorsal stream (Elston et al. 1999a). Here, neither the PCA nor the cluster analyses split V2Lant and V2Lpost neurons in distinct groups.

Conclusion

The aim of this study was to classify layer V pyramidal neurons involved in long-distance feedback connections onto V1 using the morphology of their dendritic arbors. Reconstructed neurons came from V2Lant, V2Lpost, V2M, A1 and S1 from both hemispheres. We found that they were all tall-simple or short neurons and that it was not possible to sort them in separate groups related to the hemisphere, sensory modality or hierarchical level of the cortical area to which they belong. The target, in this case V1, could therefore be a major influence on their dendritic arborization. Including basal

dendrites and oblique apical dendrites in the morphological analysis results in a classification of neurons beyond the dichotomous tall-simple and short categories proposed for corticocortical projecting pyramidal neurons. This is a more elaborate differentiation of dendrites of layer V pyramidal neurons that contribute to the feedback projection onto the primary visual cortex, a differentiation that likely emerges through experience-dependent shaping of the arborization during development.

Acknowledgements

We are grateful to Kazumi Ohta for technical expertise concerning viral tracer injections and to Marco Rodriguez for cluster and principal component analyses. This work was supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada grants to DB and GB and by a Canadian Foundation for Innovation grant to DB, and funding from RIKEN Brain Science Organization to KSR. MEL is supported by an Alexander Graham Bell (NSERC) fellowship and travel to Japan was supported by the Réseau de la Recherche en Santé de la Vision FRSQ.

References

- Akemann W, Zhong YM, Ichinohe N, Rockland KS and Knopfel T. 2004. Transgenic mice expressing a fluorescent *in vivo* label in a distinct subpopulation of neocortical layer 5 pyramidal cells. *J Comp Neurol*. 480:72-88.
- Bai WZ, Ishida M and Arimatsu Y. 2004. Chemically defined feedback connections from infragranular layers of sensory association cortices in the rat. *Neuroscience*. 123:257-267.
- Barone P, Batardiere A, Knoblauch K and Kennedy H. 2000. Laminar distribution of neurons in extrastriate areas projecting to visual areas V1 and V4 correlates with the hierarchical rank and indicates the operation of a distance rule. *J Neurosci*. 20:3263-3281.
- Benavides-Piccione R, Hamzei-Sichani F, Ballesteros-Yanez I, Defelipe J and Yuste R. 2006. Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions. *Cereb Cortex*. 16:990-1001.
- Borra E and Rockland KS. 2011. Projections to early visual areas v1 and v2 in the calcarine fissure from parietal association areas in the macaque. *Front Neuroanat*. 5:35.
- Budinger E, Heil P, Hess A and Scheich H. 2006. Multisensory processing via early cortical stages: Connections of the primary auditory cortical field with other sensory systems. *Neuroscience*. 143:1065-1083.
- Callaway EM and Borrell V. 2011. Developmental sculpting of dendritic morphology of layer 4 neurons in visual cortex: influence of retinal input. *J Neurosci*. 31:7456-7470.
- Campi KL, Bales KL, Grunewald R and Krubitzer L. 2010. Connections of auditory and visual cortex in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*): evidence for multisensory processing in primary sensory areas. *Cereb Cortex*. 20:89-108.
- Cannon RC, Wheal HV and Turner DA. 1999. Dendrites of classes of hippocampal neurons differ in structural complexity and branching patterns. *J Comp Neurol*. 413:619-633.
- Caviness VS, Jr. 1975. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol*. 164:247-263.
- Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ and Prince DA. 1990. Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J Comp Neurol*. 296:598-613.

Chen CC, Abrams S, Pinhas A and Brumberg JC. 2009. Morphological heterogeneity of layer VI neurons in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol.* 512:726-746.

Clavagnier S, Falchier A and Kennedy H. 2004. Long-distance feedback projections to area V1: implications for multisensory integration, spatial awareness, and visual consciousness. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 4:117-126.

Coogan TA and Burkhalter A. 1993. Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J Neurosci.* 13:3749-3772.

De Felipe J and Farinas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex - morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 39:563-607.

Elston GN, Elston A, Aurelio-Freire M, Gomes LW, Dias IA, Pereira A, Jr., Silveira LC and Picanco Diniz CW. 2006. Specialization of pyramidal cell structure in the visual areas V1, V2 and V3 of the South American rodent, *Dasyprocta prinnolopha*. *Brain Res.* 1106:99-110.

Elston GN and Rosa MG. 1997. The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer III of functionally related cortical visual areas. *Cereb Cortex.* 7:432-452.

Elston GN and Rosa MG. 2000. Pyramidal cells, patches, and cortical columns: a comparative study of infragranular neurons in TEO, TE, and the superior temporal polysensory area of the macaque monkey. *J Neurosci.* 20:RC117.

Elston GN and Rosa MG. 2006. Ipsilateral corticocortical projections to the primary and middle temporal visual areas of the primate cerebral cortex: area-specific variations in the morphology of connectionally identified pyramidal cells. *Eur J Neurosci.* 23:3337-3345.

Elston GN, Tweedale R and Rosa MG. 1999a. Cellular heterogeneity in cerebral cortex: a study of the morphology of pyramidal neurones in visual areas of the marmoset monkey. *J Comp Neurol.* 415:33-51.

Elston GN, Tweedale R and Rosa MG. 1999b. Cortical integration in the visual system of the macaque monkey: large-scale morphological differences in the pyramidal neurons in the occipital, parietal and temporal lobes. *Proc Biol Sci.* 266:1367-1374.

Falchier A, Clavagnier S, Barone P and Kennedy H. 2002. Anatomical evidence of multimodal integration in primate striate cortex. *J Neurosci.* 22:5749-5759.

Fame RM, MacDonald JL and Macklis JD. 2011. Development, specification, and diversity of callosal projection neurons. *Trends Neurosci.* 34:41-50.

Felleman DJ and Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 1:1-47.

Fuentealba P, Tomioka R, Dalezios Y, Marton LF, Studer M, Rockland K, Klausberger T and Somogyi P. 2008. Rhythmically active enkephalin-expressing GABAergic cells in the CA1 area of the hippocampus project to the subiculum and preferentially innervate interneurons. *J Neurosci.* 28:10017-10022.

Games KD and Winer JA. 1988. Layer V in rat auditory cortex: projections to the inferior colliculus and contralateral cortex. *Hear Res.* 34:1-25.

Groh A, Meyer HS, Schmidt EF, Heintz N, Sakmann B and Krieger P. 2010. Cell-type specific properties of pyramidal neurons in neocortex underlying a layout that is modifiable depending on the cortical area. *Cereb Cortex.* 20:826-836.

Hall AJ and Lomber SG. 2008. Auditory cortex projections target the peripheral field representation of primary visual cortex. *Exp Brain Res.* 190:413-430.

Hallman LE, Schofield BR and Lin CS. 1988. Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat. *J Comp Neurol.* 272:149-160.

Hattox AM and Nelson SB. 2007. Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J Neurophysiol.* 98:3330-3340.

Heumann H and Wittum G. 2009. The tree-edit-distance, a measure for quantifying neuronal morphology. *Neuroinformatics.* 7:179-190.

Hubener M and Bolz J. 1988. Morphology of identified projection neurons in layer 5 of rat visual cortex. *Neurosci Lett.* 94:76-81.

Hubener M, Schwarz C and Bolz J. 1990. Morphological types of projection neurons in layer 5 of cat visual cortex. *J Comp Neurol.* 301:655-674.

Ichinohe N, Hyde J, Matsushita A, Ohta K and Rockland KS. 2008. Confocal mapping of cortical inputs onto identified pyramidal neurons. *Front Biosci.* 13:6354-6373.

Innocenti GM, Berbel P and Clarke S. 1988. Development of projections from auditory to visual areas in the cat. *J Comp Neurol.* 272:242-259.

Jacobs B, Driscoll L and Schall M. 1997. Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol.* 386:661-680.

Jacobs B, Schall M, Prather M, Kapler E, Driscoll L, Baca S, Jacobs J, Ford K, Wainwright M and Trembl M. 2001. Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study. *Cereb Cortex.* 11:558-571.

Kasper EM, Larkman AU, Lubke J and Blakemore C. 1994. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J Comp Neurol.* 339:459-474.

Koester SE and O'Leary DD. 1992. Functional classes of cortical projection neurons develop dendritic distinctions by class-specific sculpting of an early common pattern. *J Neurosci.* 12:1382-1393.

Krubitzer L. 1995. The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different? *Trends Neurosci.* 18:408-417.

Laramée ME, Kurotani T, Rockland KS, Bronchti G and Boire D. 2011. Indirect pathway between the primary auditory and visual cortices through layer V pyramidal neurons in V2L in mouse and the effects of bilateral enucleation. *Eur J Neurosci.* 34:65-78.

Larsen DD and Callaway EM. 2006. Development of layer-specific axonal arborizations in mouse primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 494:398-414.

Larsen DD, Luu JD, Burns ME and Krubitzer L. 2009. What are the Effects of Severe Visual Impairment on the Cortical Organization and Connectivity of Primary Visual Cortex? *Front Neuroanat.* 3:30.

Larsen DD, Wickersham IR and Callaway EM. 2007. Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex. *Front Neural Circuits.* 1:5.

Legendre P and Legendre L. 1998. Numerical Ecology. 2nd. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier.

Mason A and Larkman A. 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci.* 10:1415-1428.

Miller MW and Vogt BA. 1984. Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor, and association cortices. *J Comp Neurol.* 226:184-202.

Molnár Z and Cheung AF. 2006. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res.* 55:105-115.

Molyneaux BJ, Arlotta P, Fame RM, MacDonald JL, MacQuarrie KL and Macklis JD. 2009. Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J Neurosci.* 29:12343-12354.

Olavarria J and Montero VM. 1989. Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections. *Visual Neurosci.* 3:59-69.

Papp E, Borhegyi Z, Tomioka R, Rockland KS, Mody I and Freund TF. 2011. Glutamatergic input from specific sources influences the nucleus accumbens-ventral pallidum information flow. *Brain Struct Funct.*

Reid AT, Krumnack A, Wanke E and Kotter R. 2009. Optimization of cortical hierarchies with continuous scales and ranges. *Neuroimage.* 47:611-617.

Rockland KS. 2004. Feedback Connections: Splitting the Arrow. In: Kaas, JH & Collins, CE, editors. *The Primate Visual System*. 1st ed. Boca Raton (FL): CRC Press. P 387-405.

Rockland KS and Ojima H. 2003. Multisensory convergence in calcarine visual areas in macaque monkey. *Int J Psychophysiol.* 50:19-26.

Rockland KS and Pandya DN. 1979. Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey. *Brain Res.* 179:3-20.

Romand S, Wang Y, Toledo-Rodriguez M and Markram H. 2011. Morphological development of thick-tufted layer v pyramidal cells in the rat somatosensory cortex. *Front Neuroanat.* 5:5.

Sanchez-Vives MV, Nowak LG, Descalzo VF, Garcia-Velasco JV, Gallego R and Berbel P. 2006. Crossmodal audio-visual interactions in the primary visual cortex of the visually deprived cat: a physiological and anatomical study. *Prog Brain Res.* 155:287-311.

Schofield BR, Hallman LE and Lin CS. 1987. Morphology of corticotectal cells in the primary visual cortex of hooded rats. *J Comp Neurol.* 261:85-97.

Soloway AS, Pucak ML, Melchitzky DS and Lewis DA. 2002. Dendritic morphology of callosal and ipsilateral projection neurons in monkey prefrontal cortex. *Neurosci.* 109:461-471.

Tomioka R and Rockland KS. 2006. Improved Golgi-like visualization in retrogradely projecting neurons after EGFP-adenovirus infection in adult rat and monkey. *J Histochem Cytochem.* 54:539-548.

Tsiola A, Hamzei-Sichani F, Peterlin Z and Yuste R. 2003. Quantitative morphologic classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex. *J Comp Neurol.* 461:415-428.

Vercelli A and Innocenti GM. 1993. Morphology of visual callosal neurons with different locations, contralateral targets or patterns of development. *Exp Brain Res.* 94:393-404.

Vezoli J, Falchier A, Jouve B, Knoblauch K, Young M and Kennedy H. 2004. Quantitative analysis of connectivity in the visual cortex: extracting function from structure. *Neuroscientist.* 10:476-482.

Wang Q and Burkhalter A. 2007. Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol.* 502:339-357.

Wang Q, Gao E and Burkhalter A. 2011. Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J Neurosci.* 31:1905-1918.

Table legends

Table 1. A total of 63 layer V pyramidal neurons have been reconstructed from A1, S1, V2M, V2Lant and V2Lpost, of both hemispheres.

Table 2. Presentation of the number of neurons, for each mouse, that were reconstructed for each cortical area.

Table 3. Twenty-five morphological parameters analyzed for each reconstructed neuron. Only those with a loading equal to or greater than 0.70 in one of the six first PCs were kept for subsequent analyses (in bold). Below each PC, the corresponding Eigenvalue and percentage of variance are indicated.

Table 4. Number and percentage (in parenthesis) of neurons from each cortical area with respect to their classification as obtained with the cluster analysis. Neurons from a given area were not restricted to one group of the cluster.

Figure Legends

Figure 1. AdSynEGFP injections and labeling. A) Injection site in V1 (asterisk). AdSynEGFP injections covered all cortical layers without encroaching on the subcortical white matter. Note the column of retrograde labeling in V2L. Nissl counterstaining was used to delineate areal borders. B) Retrograde labeling of a callosal layer V pyramidal neuron from A1. C) High magnification of rectangle in (B) to show the high resolution labeling of dendrites and dendritic spines. Scale bars: 1cm in A, 50 μ m in B and 10 μ m in C.

Figure 2. Schematic representation of the localization of injection site into V1 and retrograde labeling within V2L. To visualize the AdSynEGFP injection site in V1 (black spot), the borders were traced on subsequent coronal sections and represented in a dorsal projection view of the posterior neocortex in three representative cases (A,B and C). They were all centrally located. In the five mice used in this study, retrogradely labeled neurons in V2L were grouped in two patches (circles in V2L) identified as V2Lant and V2Lpost. D) Identification of V1, V2M and V2L onto the canvas that has been used in A, B and C. Bottom right, identification of the axes: a, anterior and m, medial.

Figure 3. Principal component analysis. A-C) Representation of all reconstructed neurons color coded for each cluster in the three firsts principal components (PCs), which accounted for 65.59% of the total variance of the population. D) Three dimensional representation of the three firsts PCs. No isolated clusters can be found. Instead, the distribution appears stretched out with respect to the first PC.

Figure 4. Reconstructed neurons. Of the 63 reconstructed neurons, 20 are shown here. Each neurons is identified with a cell number that correspond to the one found in the cluster analysis (Fig. 6) and to its score in the first principal component (PC1). The values ranged from -1.80 to 2.40 and cells are shown for approximate 0.21 increments. The factors most contributing to the first PC loading are the volume of the oblique

dendrites (0.839), of the apical dendrite (0.820) and of the basal dendrites (0.730). Note the range of neuronal morphologies that can be observed. Scale bar: 100 μ m.

Figure 5. Localization of oblique dendrites. Oblique dendrites (in red) are not evenly distributed along the apical trunk. Instead, they arise from the first microns of the apical trunk, are mainly arborized within layer V and are intermingled with the basal dendrites. This is cell 43 from figure 4. Scale bar: 100 μ m.

Figure 6. Cluster analysis. Using the thirteen parameters that remains after the principal component analysis (see Table 1), the cluster analysis suggests that there are six groups (1-6). None of these groups are representative of a hemisphere, a sensory modality or a hierarchical rank. Each neuron is identified by the cortical area to which it belongs and by its cell number.

Figure 7. Sholl analysis of basal dendrites. The dendritic length (left row), number of spines (middle row) and spine density (right row), as obtained with the Sholl analysis, were compared between commissural (grey line) and non-commissural (black line) neurons. Radius size increment is 30 μ m for all parameters and spine density is measured as number of spines per 10 μ m of dendritic length within each 30 μ m radius. All Y-axis are set to equivalent values, for each row, to compare areas. Neurons projecting onto V1 are characterized by short or long dendrites with few or many spines. This morphological heterogeneity is observed in all cortical areas.

Figure 8. Spine distribution. For all dendritic compartments, the number of spines per cortical layer is compared between non-commissural (straight line) and commissural neurons (dashed line). Error bars: SEM. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Supplementary Figures legend

Supplementary Figure 1. Sholl analysis of apical dendrites. The apical dendrite includes the apical trunk, oblique dendrites and apical tuft. As for the basal dendrites, the total dendritic length (left row), number of spines (middle row) and spine density (right row), were compared between commissural (grey line) and non-commissural (black line) neurons. The radius size increment was set to 30 μ m and spine density was measured as number of spines per 10 μ m of dendritic length. For each row, all Y-axis are set to equivalent values. In the dendritic length and spine number graphs, the first peak corresponds to the highly arborized oblique dendrites close to the soma (see Fig. 5) and the second peak represents the apical tuft. The inset in the spine number graph of A1 shows one neuron that has approximately three times more spines in the 120 and 150 μ m radii. It was withdrawn from the main graph to have a reasonable scale for the other neurons. With the sholl analysis, it is apparent that the apical dendrite of neurons projecting onto V1 can exhibit a range of morphologies, from short to long with few or many spines. This morphological heterogeneity is observed in all cortical areas.

Table 1

Cortex	Ipsilateral	Contralateral	Total
A1	10	9	19
S1	5	5	10
V2M	5	5	10
V2L ant	6	6	12
V2L post	6	6	12
Total	32	31	63

Table 2

Cortex	Mouse number				
	1	2	3	4	5
A1	6	5	2	3	3
S1	6	2	1	1	0
V2M	4	2	1	1	2
V2Lant	4	2	1	4	1
V2Lpost	2	4	3	1	2
total	22	15	8	10	8

Table 3

		PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
	Eigenvalues	7.56	5.14	3.70	2.18	1.84	1.13
	% variance	30.25	20.55	14.79	8.73	7.35	4.53
Soma	Area	0.67	-0.12	-0.29	0.10	-0.23	0.12
Basal	Quantity	0.06	-0.49	-0.21	0.59	-0.33	0.07
dendrites	Number of endings	0.24	-0.04	-0.13	0.84	0.03	-0.32
	Number of spines	0.71	-0.29	-0.31	0.12	0.42	-0.21
	Total length	0.62	-0.33	-0.28	0.38	0.41	-0.22
	Volume	0.73	-0.42	-0.45	0.08	0.14	0.01
	Mean terminal distance						
	from the cell body	0.53	-0.26	0.12	-0.22	0.61	0.10
	Diameter	0.61	-0.43	-0.49	-0.22	-0.08	0.18
Apical trunk	Number of endings	0.32	0.86	0.03	0.24	-0.11	-0.05
	Number of spines	0.72	0.40	-0.11	-0.23	0.22	-0.21
	Total length	0.57	0.74	0.06	-0.02	0.06	0.02
	Volume	0.82	-0.09	-0.13	0.11	-0.37	0.20
	Mean terminal distance						
	from the cell body	0.36	0.07	0.57	0.42	0.17	0.46
	Diameter	0.50	-0.49	-0.42	-0.22	-0.37	0.26
	Distance of the bifurcation	0.18	-0.14	0.58	0.47	0.22	0.43
Apical tuft	Number of endings	0.34	0.85	0.04	0.25	-0.07	-0.09
	Number of spines	0.54	0.69	-0.14	-0.23	0.10	0.02
	Total length	0.48	0.78	-0.02	-0.04	0.06	0.14
	Volume	0.67	0.52	-0.22	-0.14	-0.16	0.24
Oblique	Quantity	0.39	-0.26	0.71	-0.14	-0.22	-0.02
dendrites	Number of endings	0.36	-0.04	0.77	0.07	-0.34	-0.25
	Number of spines	0.71	-0.32	0.42	-0.21	-0.03	-0.27
	Total length	0.61	-0.24	0.64	-0.11	-0.18	-0.24
	Volume	0.84	-0.32	0.16	-0.17	-0.25	-0.09
	Distribution along the						
	apical trunk	0.15	-0.34	0.50	-0.22	0.47	0.20

Table 4

Hemisphere	Cortical area	Group 1-2	Group 3-4	Group 5-6	Total
Ipsilateral	A1	3 (30.0)	4 (40.0)	3 (30.0)	10
	S1	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	5
	V2M	1 (20.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	5
	V2L ant	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	6
	V2L post	2 (33.3)	4 (67.7)	0 (0.0)	6
Contralateral	A1	5 (55.5)	2 (22.2)	2 (22.2)	9
	S1	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	5
	V2M	1 (20.0)	0 (0.0)	4 (80.0)	5
	V2L ant	1 (16.7)	2 (33.4)	3 (50.0)	6
	V2L post	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)	6
Total		22 (34.9)	19 (30.1)	22 (34.9)	63

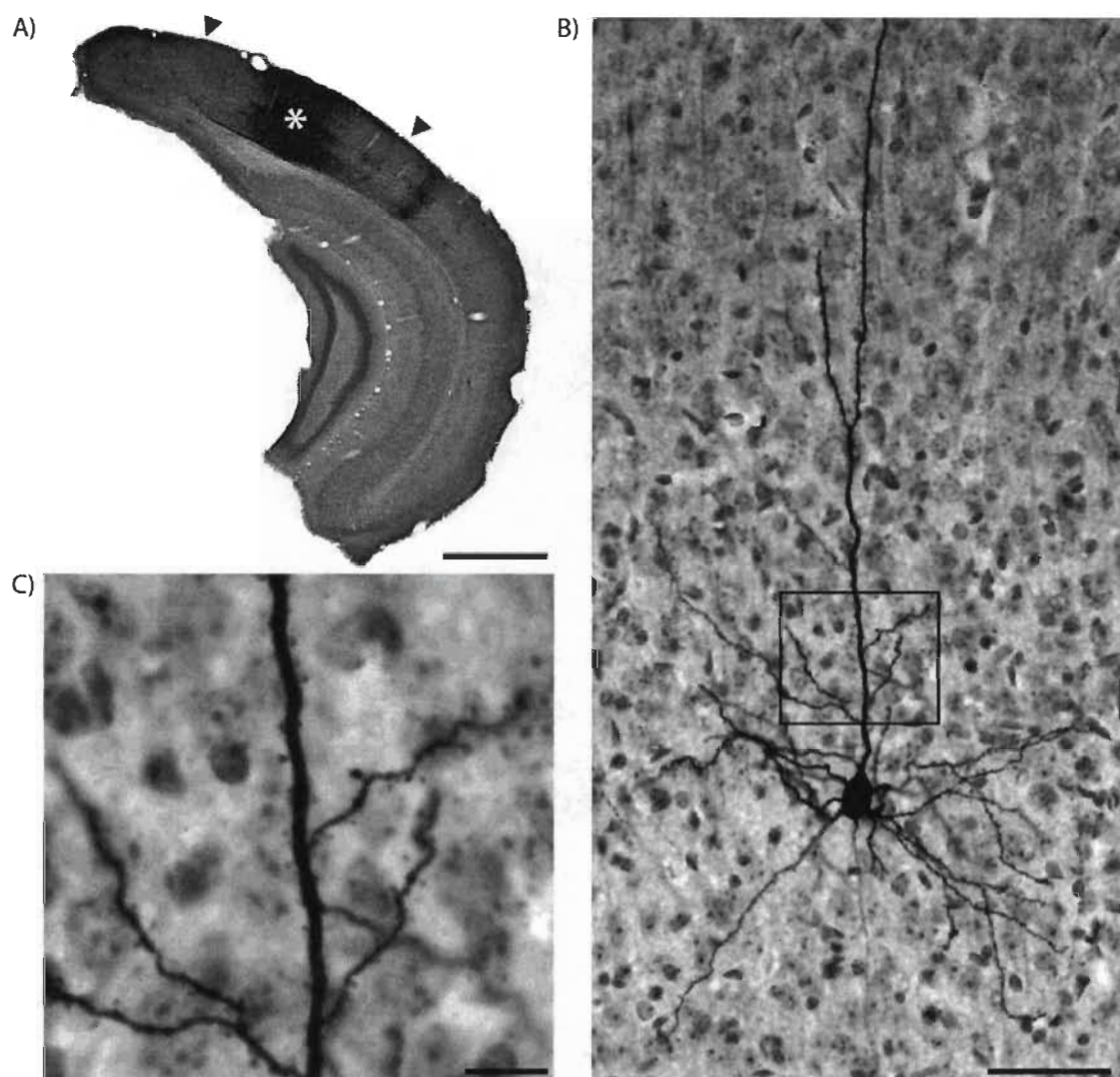
Figure 1

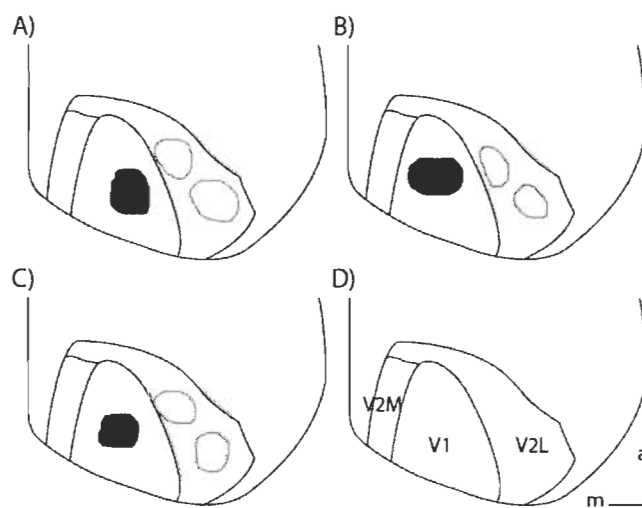
Figure 2

Figure 3

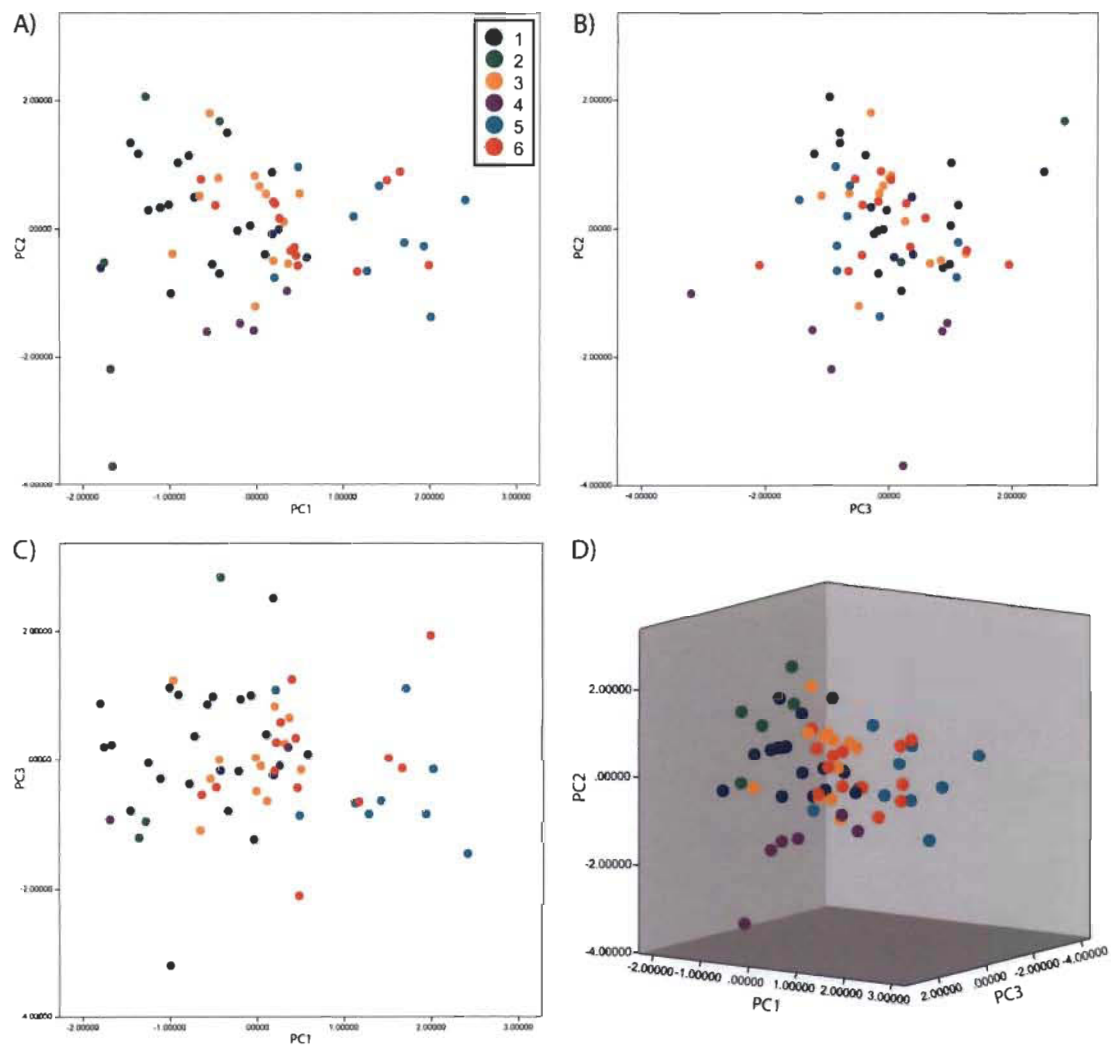


Figure 4

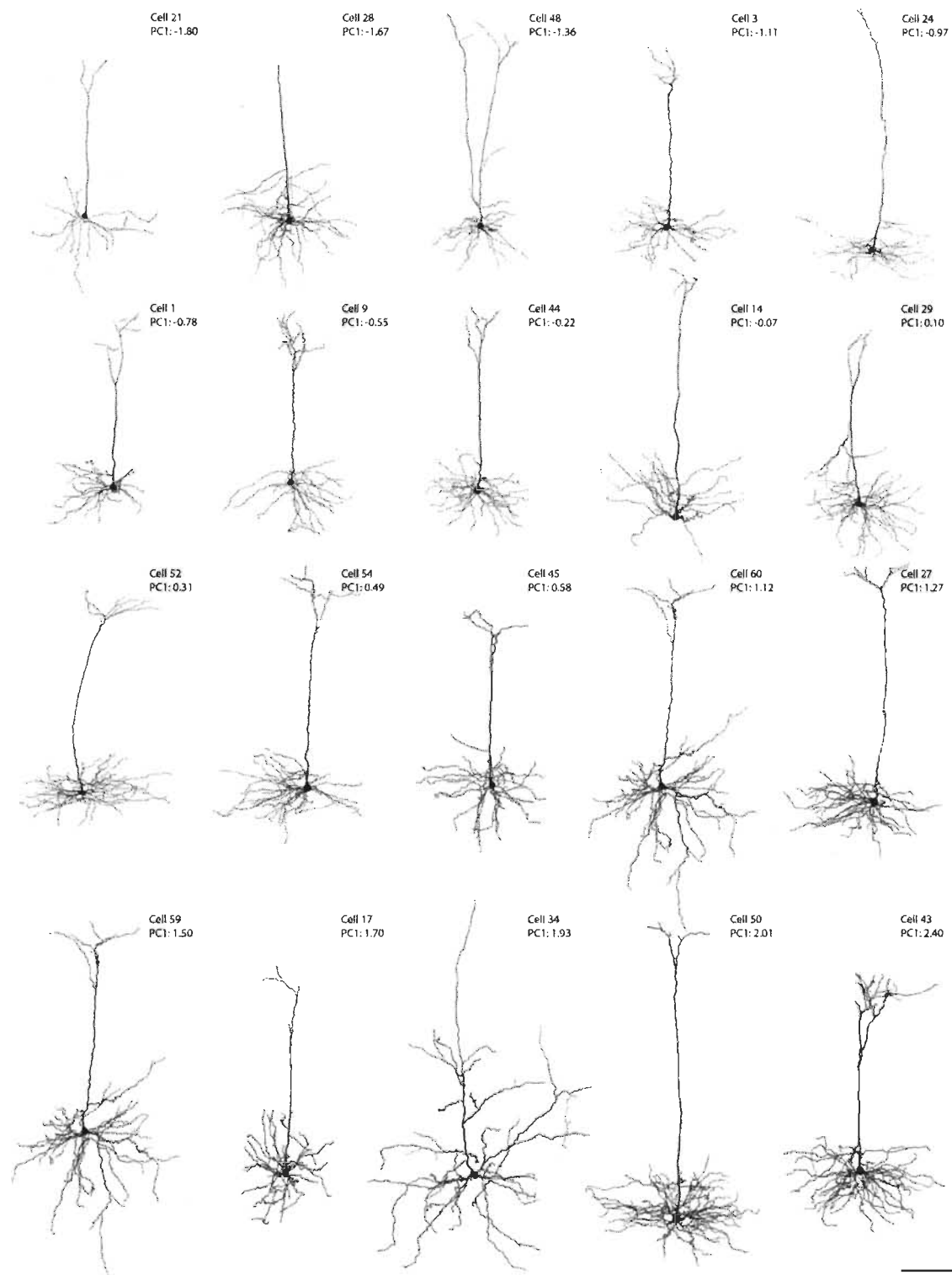


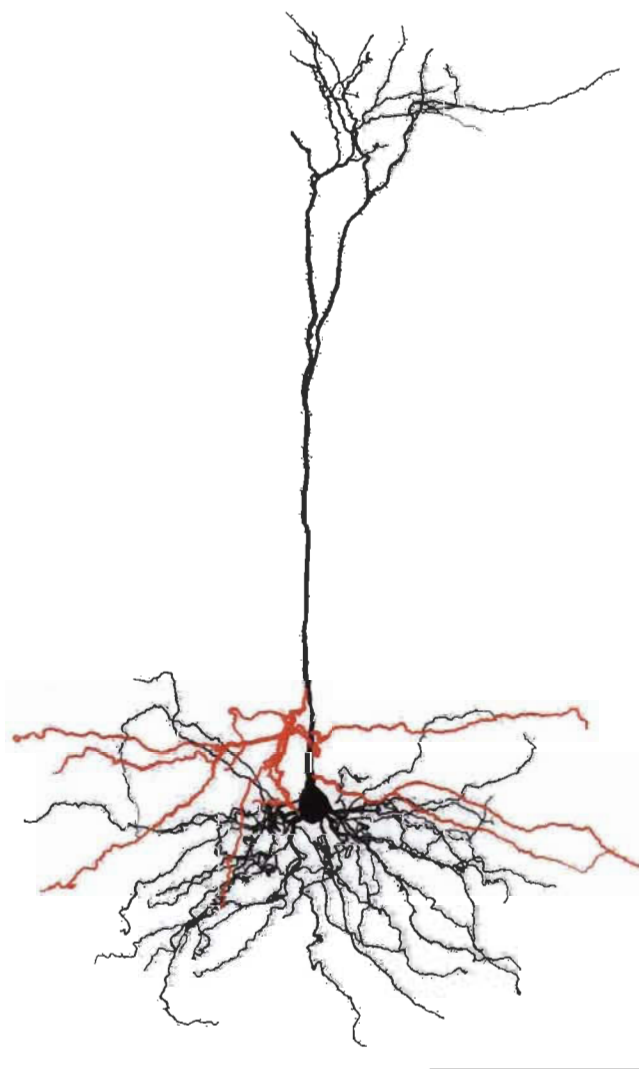
Figure 5

Figure 6

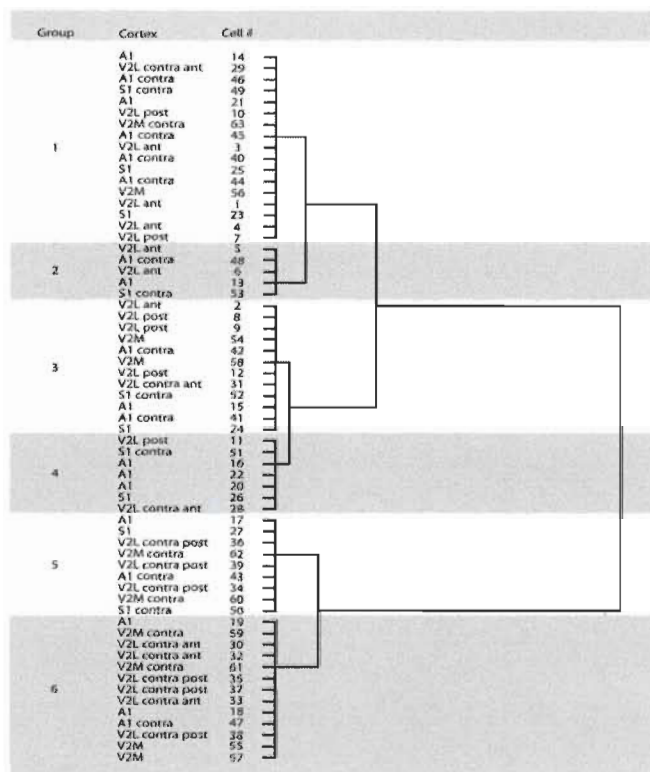


Figure 7

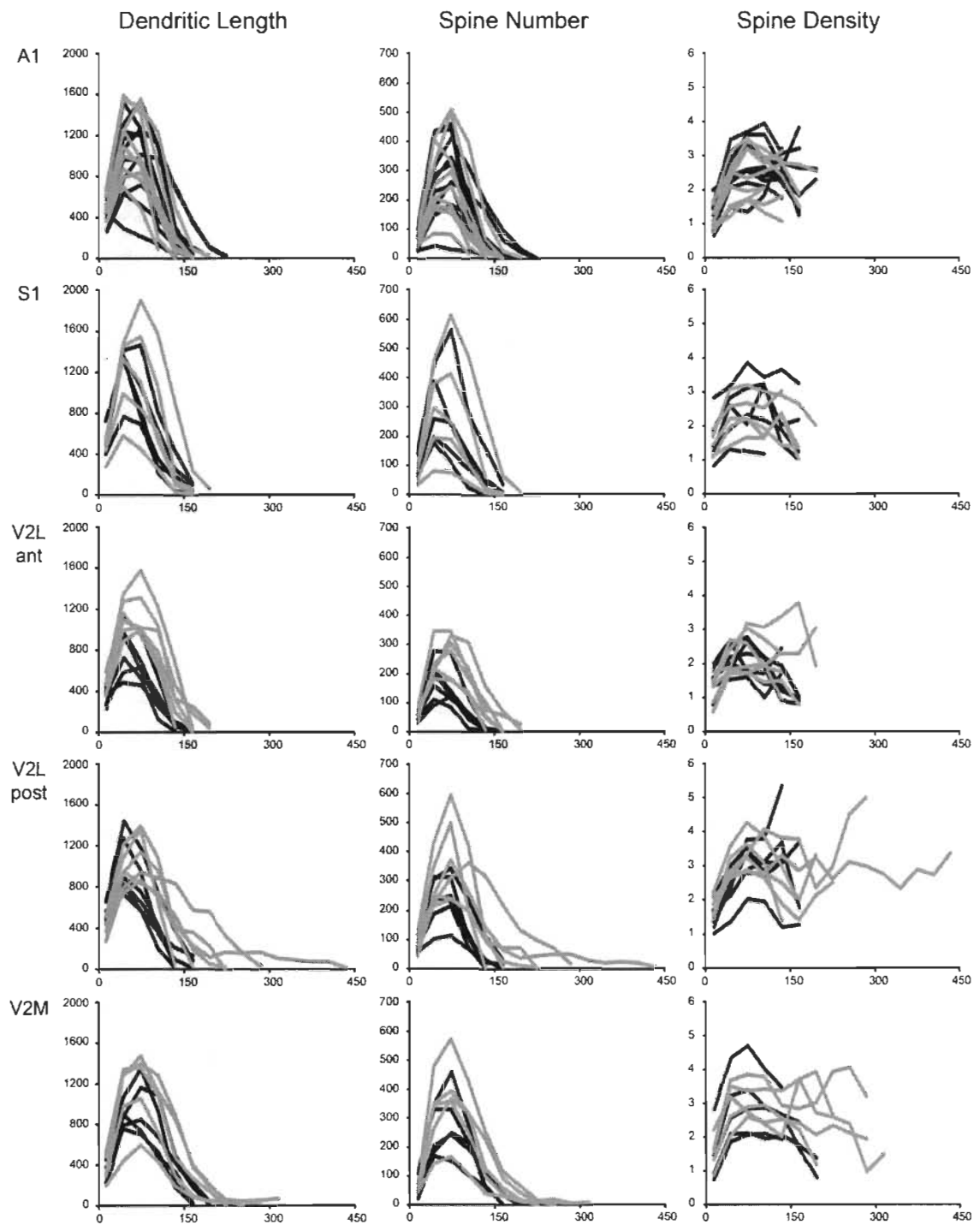
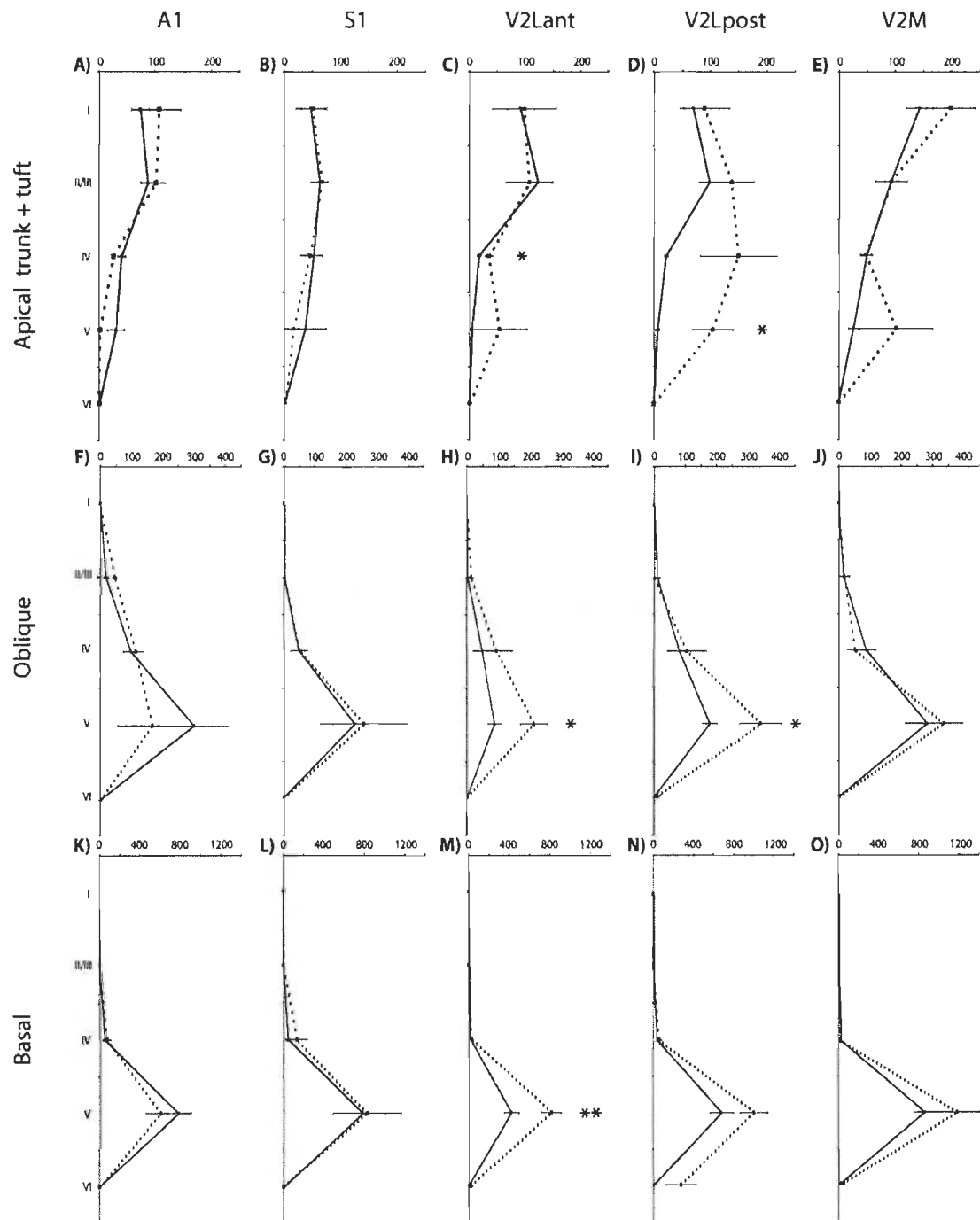
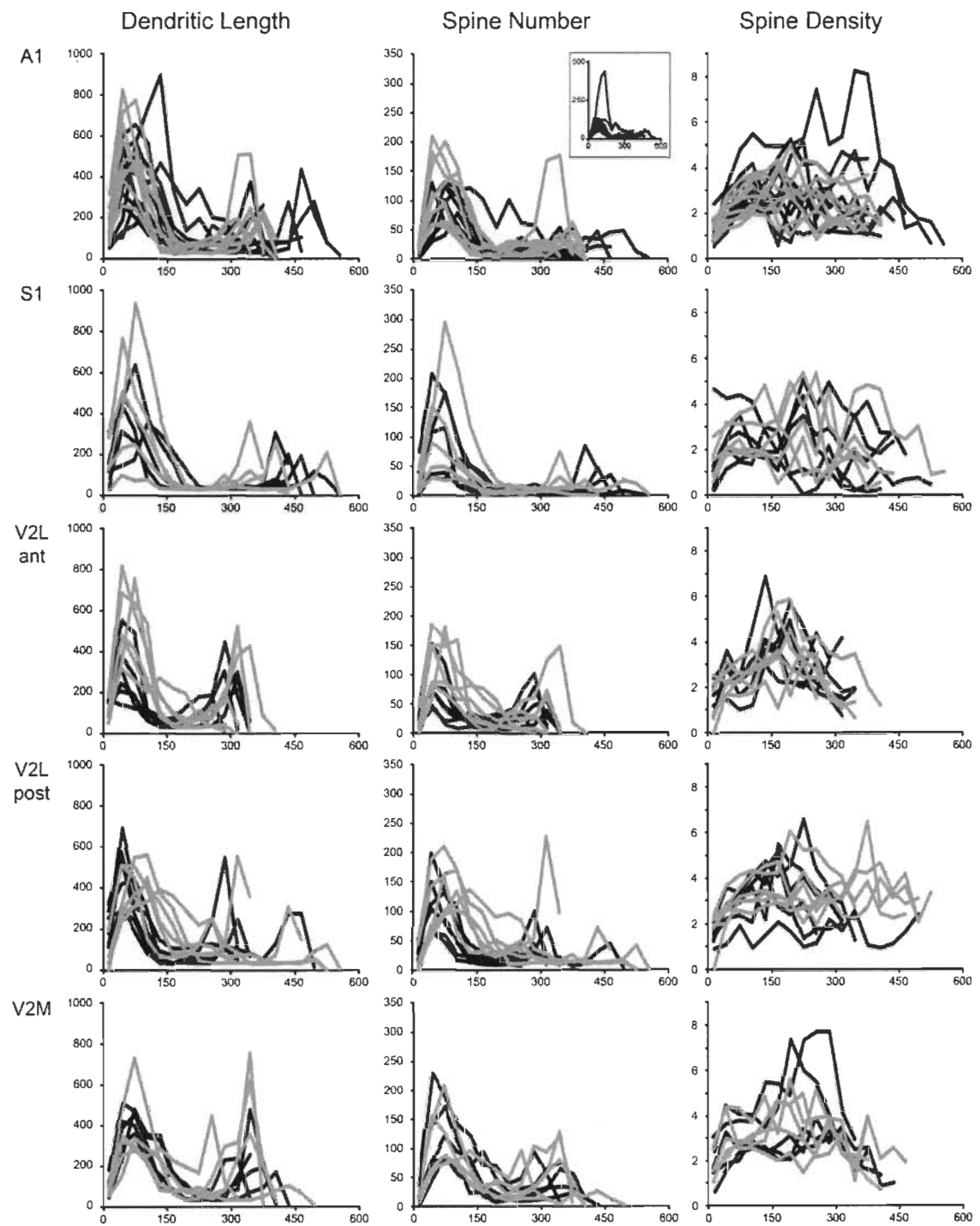


Figure 8



Supplementary Figure 1.



CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les facteurs impliqués dans le développement des circuits corticaux entre les aires sensorielles visuelles et non-visuelles ont été étudiés dans cette thèse. Ces travaux ont été présentés en trois volets.

6.1 Objectif 1 : Déterminer le rôle des afférences visuelles dans le développement des circuits corticaux

Dans cette première étude, nous avons tenté de déterminer si l'activité visuelle est un facteur déterminant dans la mise en place de la topographie des connexions striées-extrastriées et si la distribution des connexions calleuses influence aussi leur développement. Cette étude a été effectuée chez des souris voyantes, énucléées à la naissance et anophtalmes, de manière à comparer l'effet de l'expérience visuelle prénatale et postnatale sur le développement de ces circuits corticaux.

Dans la littérature, il a été suggéré que les aires extrastriées se développent dans des zones acalleuses (Olavarria & Montero 1984) entourées de bandes de projections calleuses. Ces dernières marquent la position de la représentation du méridien vertical (voir section 1.2.2). Cependant, une déprivation visuelle entraîne un agrandissement des territoires occupés par les projections striées-extrastriées et une désorganisation des projections calleuses (voir section 1.5.2.2). Le lien entre ces deux distributions, ainsi que la représentation topographique dans les aires extrastriées, n'est pas connu chez l'animal aveugle.

Puisque la distribution des projections striées-extrastriées et des connexions calleuses est affectée par l'expérience visuelle, il a été proposé qu'un mécanisme commun assure leur développement. Selon cette hypothèse, la distribution des zones de

projections striées-extrastriées et calleuses serait donc interdépendante. Une seconde hypothèse propose plutôt que l'activité visuelle influence la distribution des projections striées-extrastriées et celle des connexions calleuses par des mécanismes distincts. Dans ce cas-ci, leur développement serait donc indépendant.

Même si la carte des aires extrastriées était légèrement altérée chez les souris énucléées et très variable chez les souris anophtalmes, nous avons retrouvé chacune des aires extrastriées en périphérie du cortex visuel primaire chez les deux groupes de souris aveugles. La topographie des zones de projections striées-extrastriées était cependant désorganisée chez ces animaux. Cet effet était aussi plus marqué chez les souris anophtalmes que chez les souris énucléées. En étudiant le pourcentage de chevauchement entre les projections striées et les connexions calleuses, une grande variabilité a été remarquée chez les souris énucléées.

Ces résultats suggèrent que des facteurs intrinsèques, exprimés pendant la phase embryonnaire, assurent la disposition des aires extrastriées en périphérie du cortex visuel primaire. Par contre, puisque la distribution de ces aires en périphérie du cortex visuel primaire était altérée chez les animaux aveugles, les facteurs extrinsèques pourraient aussi être impliqués. De plus, puisque la topographie des connexions ascendantes entre le cortex visuel primaire et les aires extrastriées était plus désorganisée chez les souris anophtalmes que chez les souris énucléées, les résultats suggèrent que l'activité spontanée de la rétine pendant la phase embryonnaire pourrait être nécessaire à la mise en place d'un patron de connexion normal. Il est aussi possible que l'activité non-visuelle dans le cortex visuel primaire des souris anophtalmes (Chabot et al. 2007; Piche et al. 2004) influence le développement de cette connectivité.

Cependant, il est difficile de conclure avec certitude du rôle de l'information prénatale dans le façonnement des connexions corticales par l'étude de la souche de souris anophtalmes. Les souris ZRDCT ne sont pas de la lignée C57BL/6 et les différences entre ces deux souris pourraient être le produit de différences entre les souches. Il est cependant important de noter que les différences entre les projections

calleuses et les projections striées-extrastriées entre des rats intacts, énucléées à la naissance et anophtalmes sont très semblables aux résultats présentés ici. Il est donc très possible que les différences entre nos souris énucléées et anophtalmes soient effectivement attribuables à l'effet de l'activité rétinienne prénatale. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que ces différences soient le résultat de différences de souches avec les expériences effectuées dans le cadre de cette thèse.

Finalement, la plus grande variabilité du chevauchement entre les projections striées-extrastriées et les connexions calleuses retrouvée chez les souris énucléées pourrait indiquer une plus grande indépendance de ces deux projections. L'activité visuelle semble essentielle au développement normal des projections calleuses et aussi des projections striées-extrastriées. S'il y avait un mécanisme indépendant de l'activité visuelle qui limite le chevauchement entre ces deux projections par une répulsion mutuelle, par exemple, on pourrait s'attendre que l'absence d'activité visuelle n'affecte pas la complémentarité entre ces deux projections. Puisque la variabilité de ce chevauchement est plus grande chez les souris énucléées, le développement des projections calleuses et des projections striées-extrastriées ne semble pas être interdépendant.

6.1.1 Les facteurs intrinsèques et les aires extrastriées

Nous avons été en mesure de retrouver la position des aires extrastriées chez les deux modèles de souris aveugles. La cartographie de ces aires était cependant plus laborieuse pour les souris anophtalmes, chez qui la ségrégation des aires extrastriées était variable. Ceci suggère que les facteurs intrinsèques sont importants pour le développement des aires extrastriées, mais que les facteurs extrinsèques influencent aussi leur développement.

Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont montré que la régionalisation du cortex dépend principalement de deux homéogènes, soit *Pax6* et *Emx2* (Bishop et al. 2000; Bishop et al. 2002; O'Leary & Nakagawa 2002; Pallas 2001;

Rash & Grove 2006). Ces résultats supportent aussi l'hypothèse que certains facteurs extrinsèques pourraient ajuster le niveau d'expression de certains gènes, ce qui pourrait aussi influencer la carte corticale (Figure 6.1) (O'Leary et al. 2007).

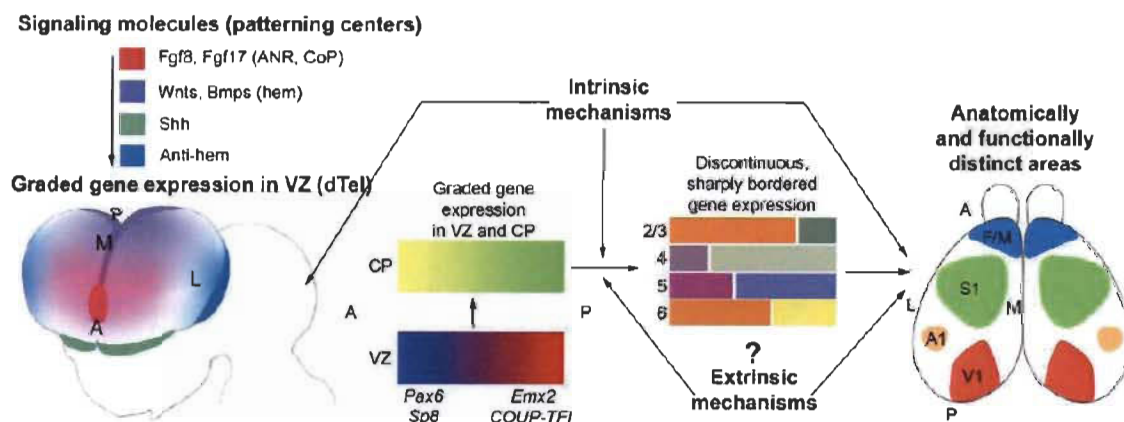


Figure 6.1 Interaction entre facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Des gradients moléculaires (*signaling molecules*) entraînent l'expression de différents gradients de gènes dans la zone ventriculaire (VZ) et la plaque corticale (CP). Dans ces structures, les facteurs de transcription, comme Pax6 et Emx2, déterminent le destin des précurseurs corticaux, qui donneront naissance aux différents neurones. En même temps, les couches corticales et les aires corticales se mettent en place. Le développement initial de ces structures requiert l'action de facteurs intrinsèques, mais leur différenciation est associée à l'influence de facteurs extrinsèques (O'Leary et al. 2007).

6.1.2 L'activité spontanée de la rétine

Les souris énucléées et les souris anophtalmes sont deux groupes de souris aveugles, mais des différences importantes ont été observées dans la ségrégation de leurs aires extrastriées, dans l'organisation topographique des projections striées-extrastriées et dans le chevauchement de ces projections avec les projections calleuses. Les souris énucléées se distinguent des souris anophtalmes par la présence d'une rétine et d'un nerf optique pendant le développement embryonnaire (voir sections 2.1.2 et 2.1.3). Chez l'embryon, des vagues d'activité spontanée parcourent la rétine en développement (voir section 1.5.2).

L'activité spontanée de la rétine pourrait donc participer au développement normal des connexions du cortex visuel primaire vers les aires extrastriées et pourrait être responsable des différences observées entre les groupes. Plus précisément, puisque les afférences rétinienne atteignent la portion dorsale du noyau latéral du thalamus vers le treizième jour embryonnaire et que les axones thalamo-corticaux arrivent dans la sous-plaque corticale vers le seizième jour embryonnaire, soit environ deux jours avant la naissance, l'activité spontanée prénatale pourrait expliquer les différences observées entre les souris énucléées et anophtalmes, alors que l'activité postnatale pourrait être responsable des différences observées entre les souris énucléées et voyantes.

6.2 Objectif 2 : Les aires extrastriées sont des relais entre les modules corticaux auditifs et visuels

Dans la deuxième étude présentée dans cette thèse, l'existence d'une connexion indirecte entre les cortex auditif et visuel primaires, qui passe par le cortex visuel secondaire latéral, a été démontrée. L'originalité de cette étude vient du fait que nous avons montré que les aires situées en périphérie des aires primaires donnent naissance à des connexions hétéromodales indirectes entre les aires sensorielles primaires. De plus, nous sommes les premiers à avoir étudié la distribution des contacts synaptiques, provenant d'une aire corticale précise, sur l'arborisation dendritique complète d'un neurone impliqué dans une connexion connue. Dans ce cas-ci, il s'agit d'afférences auditives distribuées sur l'arborisation dendritique de neurones du cortex visuel secondaire latéral qui projettent eux-mêmes au cortex visuel primaire. Nous avons aussi démontré l'effet d'une énucléation à la naissance sur cette connexion cortico-corticale indirecte.

Chez les souris voyantes, comme chez les souris énucléées, les afférences auditives établissent des contacts synaptiques potentiels sur les différents compartiments dendritiques. Le seul changement morphologique qui a été observé sur ces neurones est une augmentation du nombre de nœuds au niveau du bouquet apical; un nœud indique la présence d'une bifurcation d'une dendrite. Ces changements morphologiques étaient

différents de ceux de neurones du cortex visuel secondaire latéral qui projettent aussi vers le cortex visuel primaire, mais dont l'implication dans une connexion particulière n'a pas été déterminée. De plus, bien que le nombre d'afférences auditives était inchangé chez les souris énucléées, elles étaient redistribuées vers des dendrites d'ordre inférieur.

Ces résultats démontrent que des connexions indirectes peuvent servir à acheminer de l'information hétéromodale vers les aires sensorielles primaires. De plus, les changements observés chez les souris énucléées suggèrent que les facteurs extrinsèques permettent d'affiner les circuits corticaux mis en place pendant le développement. Finalement, puisque l'effet de l'énucléation sur l'arborisation dendritique des neurones qui participent à la connexion indirecte n'était pas le même que pour la population neuronale générale du cortex visuel secondaire latéral qui projette au cortex visuel primaire, ces résultats pourraient indiquer que ces neurones forment un sous-ensemble dans cette aire.

6.2.1 Importance de la connexion indirecte

Une étude effectuée chez des rats normaux démontre l'importance du cortex visuel secondaire latéral dans les interactions audiovisuelles (Figure 6.2) (Hirokawa et al. 2008). La connexion indirecte observée dans cette étude pourrait donc être le substrat anatomique sous-jacent à ces interactions audiovisuelles. Il est cependant important de noter que certaines études ont suggéré la présence d'interactions audiovisuelles dans les couches superficielles des collicules supérieures (King & Palmer 1985; Molotchnikoff et al. 1987). Puisque les efférences des couches superficielles sont dirigées vers le pulvinar et/ou le noyau latéral postérieur et que les neurones de cette structure projettent ensuite vers les aires visuelles corticales (voir section 1.1.1), il est possible que cette voie tecto-thalamo-corticale contribue aussi à ces interactions audiovisuelles.

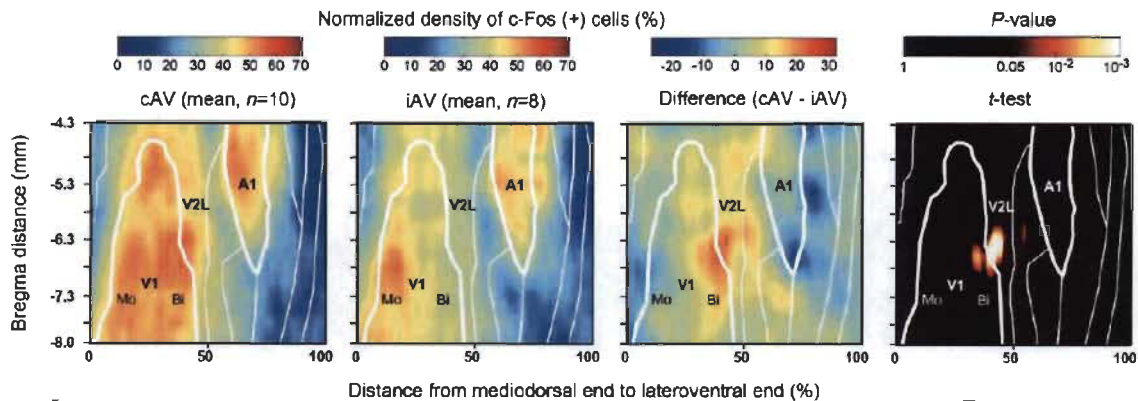


Figure 6.2 Interactions audio-visuelles dans l'aire visuelle secondaire latérale.
 À gauche, un stimulus audio-visuel est présenté. Les cortex primaires visuel (V1) et auditif (A1), ainsi que le cortex visuel secondaire latéral (V2L) sont activés. Lorsque les stimuli auditif et visuel ne sont pas synchronisés (2^e image), V2L n'est pas activé. La différence entre les niveaux d'activation lors d'un stimulus audio-visuel synchronisé et non synchronisé résulte en une carte d'activation (3^e image) démontrant la contribution de chacune des aires dans l'intégration audio-visuelle. À droite, il est démontré que l'implication de V2L dans l'intégration audio-visuelle est significative (Hirokawa et al. 2008).

Pour qu'une interaction multisensorielle donne naissance à un processus d'intégration multisensorielle, il faut que les stimuli soient synchronisés (Stein & Stanford 2008). Il a été démontré chez le furet que, dans le cas d'un stimulus audiovisuel, chaque stimulus doit être présenté dans un intervalle d'au plus 200ms (Bizley et al. 2007). Les auteurs ont aussi montré que plus la coïncidence temporelle entre les deux stimuli est grande, plus la réponse postsynaptique est importante. Le fait que les afférences auditives contactent directement les neurones de projection vers le cortex visuel primaire pourrait donc assurer des interactions rapides et synchronisées dans le cortex visuel primaire, afin d'y développer une réponse audiovisuelle optimale.

Chez la souris voyante, une stimulation auditive entraîne une forte activation du cortex auditif, alors que seuls quelques neurones sont activés dans les cortex visuels (Chabot et al. 2007). Ces résultats semblent contradictoires avec les nôtres, qui démontrent que des neurones du cortex visuel primaire reçoivent des afférences auditives directement sur leur arborisation dendritique.

Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer cette divergence dans les résultats. Premièrement, il est possible que peu de neurones du cortex visuel secondaire latéral reçoivent des afférences auditives directes. Notre but était de déterminer si une telle connexion indirecte existe et non de comptabiliser tous les neurones du cortex visuel secondaire latéral qui reçoivent au moins un contact synaptique auditif. Ce nombre pourrait donc correspondre aux neurones identifiés dans l'étude de Chabot (2007). Deuxièmement, il se peut que cette connexion agisse sous le seuil d'activation des neurones du cortex visuel secondaire latéral. Ce type d'activation auditive subliminaire a déjà été documentée dans les aires extrastriées chez le chat (Allman et al. 2008; Allman et al. 2009; Allman & Meredith 2007; Clemo et al. 2008). Troisièmement, il est probable que cette connexion soit silencieuse chez la souris voyante. Chez l'humain voyant, cinq jours de déprivation visuelle, par le bandage des yeux, sont suffisants pour recruter le cortex visuel lors de stimulations auditives ou tactiles (Kauffman et al. 2002; Merabet et al. 2008; Pascual-Leone & Hamilton 2001). Ces auteurs ont aussi démontré que cet effet disparaît 24 heures après le retour de la vision normale. Puisque ces changements sont très rapides, il est peu probable que de nouvelles connexions se soient établies, puis rétractées. Un démasquage de connexions préexistantes avait donc été proposé (Kauffman et al. 2002; Pascual-Leone et al. 2005; Pascual-Leone & Hamilton 2001).

6.2.2 Effet de l'expérience visuelle sur la connexion indirecte

Nous avons démontré que l'énucléation à la naissance augmente la quantité de nœuds au niveau du bouquet apical et réduit la complexité de la dendrite apicale près du corps cellulaire. De plus, alors que le nombre d'afférences auditives reste inchangé, ces contacts synaptiques sont relocalisés sur des dendrites d'ordre inférieur.

L'arborisation du bouquet apical significativement plus complexe chez les souris énucléées pourrait favoriser la formation de connexions dans les couches superficielles. Ces dernières sont la source de connexions *feedback* unimodales et multimodales (Kennedy & Bullier 1985; Rockland & Ojima 2003; Rockland & Pandya 1979).

Nous avons démontré qu'il y a moins de nœuds sur la dendrite apicale à proximité du corps cellulaire et que les afférences auditives étaient distribuées sur des dendrites d'ordre inférieur chez les souris énucléées que chez les souris intactes. La distance d'un contact par rapport au corps cellulaire influence l'impact qu'un contact synaptique aura sur le neurone postsynaptique (Williams & Stuart 2002; 2003). La présence de nombreuses bifurcations aura aussi comme effet d'atténuer le signal perçu au niveau du corps cellulaire (Spruston 2008). Cette redistribution des contacts sur des dendrites d'ordre inférieur chez la souris énucléée pourrait donc signifier que l'information auditive doit franchir moins de bifurcations pour atteindre le corps cellulaire du neurone de l'aire visuelle secondaire latérale. Ceci pourrait donc faire en sorte que chaque contact synaptique ait une influence plus grande sur le neurone postsynaptique chez les souris énucléées que chez les souris voyantes.

L'étude de Chabot (2007) a permis de démontrer que l'aire visuelle secondaire latérale était significativement plus activée par une stimulation auditive chez les souris énucléées que chez les souris voyantes. La relocalisation des contacts synaptiques sur les dendrites d'ordre inférieur des neurones du cortex visuel secondaire latéral pourrait expliquer cette activation exacerbée chez les souris énucléées. Chez ces animaux, l'activité auditive dans le cortex visuel primaire n'était cependant pas différente de celle retrouvée chez les souris voyante (Chabot et al. 2007).

Chez les souris énucléées, l'information auditive transférée par le neurone de l'aire visuelle secondaire latérale activée pourrait ne pas être suffisante pour entraîner une réponse au-delà du seuil d'activation des neurones du cortex visuel primaire. Cette réponse subliminaire pourrait donc ne pas être détectée. Une explication alternative est que les neurones du cortex visuel primaire soient activés, mais que cette activation ne soit pas détectée par l'immunohistochimie de la protéine c-Fos. Le c-Fos est un facteur de transcription et son expression dépend principalement de l'activation des récepteurs au glutamate de type acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (Kaczmarek & Chaudhuri 1997). Il est probable que des neurones activés par d'autres voies que celle des récepteurs NMDA ne soient donc pas repérés par cette technique. Pour vérifier cette

hypothèse, il faudrait répéter l'expérience en utilisant, par exemple, la technique du 2-déoxyglucose, des enregistrements électrophysiologiques ou des techniques d'imagerie.

6.3 Objectif 3 : Facteurs qui déterminent l'hétérogénéité morphologique des neurones d'une connexion corticale descendante

Dans la troisième étude, nous avons effectué des reconstructions tridimensionnelles complètes de l'arborisation dendritique de neurones pyramidaux de la couche 5 qui projettent vers le cortex visuel primaire. Ces neurones provenaient des aires corticales visuelles secondaires médiale et latérale, ainsi que des aires primaires auditive et somesthésique. Les connexions ipsilatérales et contralatérales ont aussi été étudiées.

Les neurones pyramidaux ont une arborisation dendritique qui varie en fonction de la modalité sensorielle, de la hiérarchie corticale et de l'hémisphère cérébral (voir section 1.5.3). Ces travaux se sont principalement concentrés sur la morphologie des dendrites basales et ont utilisé des techniques de marquage de type Golgi, qui permettent de visualiser l'arborisation dendritique des neurones d'une aire corticale, sans avoir d'information sur son implication dans la connectivité corticale. Seules les études qui ont pris en considération la latéralité ont comparé la morphologie dendritique de neurones de connexion connue. Par contre, ces études ne se sont intéressées qu'à une connexion entre des aires identiques situées dans les deux hémisphères cérébraux. Une autre étude a comparé la morphologie dendritique complète de neurones pyramidaux qui projettent vers différentes cibles connues, soit des structures corticales et sous-corticales (Larsen et al. 2007). Dans cette étude, tous les neurones pyramidaux provenaient de la couche 5 du cortex somesthésique primaire. En utilisant une stratégie similaire à la nôtre, les auteurs ont montré que les neurones qui projettent au thalamus somesthésique et au collicule supérieur forment une population distincte de ceux qui projettent vers le cortex somesthésique primaire de l'hémisphère contralatéral. Nous sommes les premiers à comparer la morphologie dendritique complète de neurones pyramidaux de la couche 5

impliqués dans une connexion de type *feedback* homomodale ou hétéromodale vers une aire corticale connue.

Dans cette étude, nous avons démontré que la population neuronale qui projette vers le cortex visuel primaire est caractérisée par un éventail de morphologies dendritiques. Cette diversité morphologique forme un continuum dans lequel il est impossible de retrouver des groupes disjoints. Cependant, toutes les connexions *feedback* que nous avons étudiées ne sont pas identiques. L'analyse de groupement a effectivement permis de constater que certaines aires corticales utilisent des neurones qui ne font partie que de quelques-uns des groupes qui ont été retrouvés.

6.3.1 Hétérogénéité des connexions descendantes vers le cortex visuel primaire

La morphologie dendritique de tous les neurones qui ont été reconstruits a été analysée. Tous les neurones qui ont été reconstruits étaient caractérisés par des dendrites basales, qui s'arborescent principalement dans les couches infragranulaires, par des dendrites obliques, plus ou moins volumineuses, retrouvées le long d'une dendrite apicale qui s'étendait jusqu'aux couches superficielles où le bouquet apical s'arborisait. Tous ces neurones pouvaient donc recevoir des contacts synaptiques provenant d'afférences qui se terminent sur l'ensemble des couches corticales.

Nous avons découvert la présence d'un continuum de morphologies dans lequel aucun groupe disjoint correspondant aux facteurs proposés dans la littérature (modalité, hiérarchie et hémisphère) n'a pu être retrouvé. Dans ce continuum, même si nous n'avons pas identifié de groupes se distinguant par leur morphologie dendritique, il est possible que des sous-ensembles de neurones existent, mais que notre stratégie n'ait pas permis de les détecter.

Peu de marqueurs permettent de distinguer des populations distinctes de neurones pyramidaux, comparativement aux multiples marqueurs distinctifs qui caractérisent les populations d'interneurones inhibiteurs. En effet, en plus d'être caractérisés par

différentes arborisations dendritiques, et diverses propriétés physiologiques, les interneurons sont identifiables sur la base de l'expression de différentes protéines chélatrices de calcium, de neuropeptides et de divers canaux ioniques (Markram et al. 2004).

Les neurones pyramidaux sont généralement caractérisés par leurs arborisations dendritiques. C'est d'ailleurs l'arborisation dendritique basale des neurones des couches 2-3 qui a permis d'identifier les facteurs déterminants (modalité, hiérarchie et hémisphère) de la morphologie dendritique (voir section 1.5.3). Des populations neuronales hétérogènes ont aussi été retrouvées dans la couche 5 du cortex visuel primaire (Tsiola et al. 2003) et dans la couche 6 du cortex somesthésique primaire (Chen et al. 2009) suite à l'analyse de l'arborisation dendritique. De plus, les neurones pyramidaux de la couche 5 ont souvent été catégorisés en deux groupes distincts, soit type 1 et type 2 (Molnár & Cheung 2006), et plus récemment en trois groupes (Figure 6.3), soit *tall-tuft*, correspondant aux neurones de type 1, et en *tall-simple* et *short*, correspondant aux neurones de type 2 (Larsen & Callaway 2006). Cette classification est basée sur la longueur de la dendrite apicale. Ces deux types neuronaux ont des cibles différentes : les neurones de type 1 projettent vers des structures sous-corticales, alors que les neurones de type 2 participent à des connexions cortico-corticales (Molnár & Cheung 2006). Leurs propriétés physiologiques sont aussi distinctes : les premiers ont un patron de décharge irrégulier (bursting), alors que les seconds ont un patron de décharge régulier (regular spiking) (Chagnac-Amitai et al. 1990).

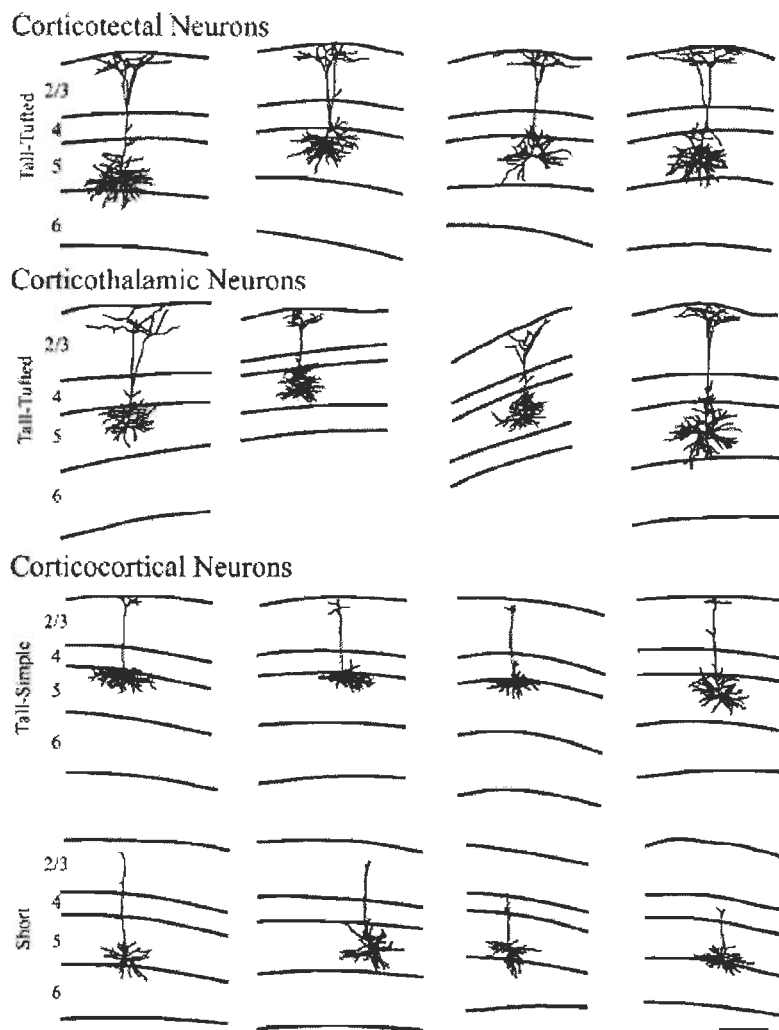


Figure 6.3 Les trois types de neurones pyramidaux de la couche 5.
 Les neurones de type *tall-tuft* projettent vers les structures sous-corticales, alors que les neurones de type *tall-simple* et *short* sont impliqués dans des connexions cortico-corticales (Larsen et al. 2007).

Depuis une dizaine d'années, les efforts concertés de différents laboratoires ont permis d'identifier quelques marqueurs qui permettent de différencier les neurones de type 1 et de type 2. Par exemple, seuls les neurones *tall-tuft* sont immunopositifs pour la protéine SMI-32, N200 et FNP-7, trois protéines de neurofilaments intermédiaires (Molnár & Cheung 2006; Voelker et al. 2004). Quelques autres marqueurs permettent aussi de distinguer les neurones de ces deux groupes (Molnár & Cheung 2006). Cependant, le nombre de marqueurs disponibles pour caractériser les neurones à l'intérieur d'un de ces deux groupes est encore limité. Par exemple, il a été démontré que

certaines neurones pyramidaux de la couche 5 impliqués dans des connexions cortico-corticales de type *feedback* vers les aires sensorielles primaires sont immunopositifs pour la latexine (Bai et al. 2004). Ces neurones participent aussi principalement aux connexions ipsilatérales (Bai et al. 2004).

Les neurones pyramidaux qui ont été reconstruits dans cette étude proviennent de plusieurs aires corticales et projettent tous vers le cortex visuel primaire. Nous avons démontré qu'ils sont caractérisés par un éventail de morphologie dendritique et qu'ils ne forment pas de groupes disjoints. Notre stratégie ne nous permet pas d'évaluer la diversité morphologique de l'ensemble des neurones pyramidaux de la couche 5 de toutes les aires corticales étudiées et d'évaluer comment les neurones de projection s'inscrivent dans cette population neuronale. À ma connaissance, une seule étude a caractérisé la morphologie des neurones pyramidaux de la couche 5 d'une aire corticale. Cette étude a utilisé un marquage de type Golgi pour caractériser les neurones pyramidaux de la couche 5 du cortex visuel primaire (Tsiola et al. 2003). Cinq groupes et plusieurs sous-groupes ont été identifiés à l'aide d'une analyse de groupement. Les neurones que nous avons reconstruits semblent correspondre au sous-groupe 1B. Ces résultats suggèrent que les neurones de projection forment un sous-groupe distinct. Afin de vérifier cette hypothèse, d'autres études devraient cependant être effectuées. Celles-ci devraient prendre en considération l'ensemble des neurones pyramidaux de la couche 5 des différentes aires sensorielles et leur connectivité. Il serait aussi intéressant d'utiliser d'autres attributs, en plus de la morphologie et de la connectivité, pour caractériser cette population neuronale.

De plus, la stratégie utilisée dans cette étude nous permet d'estimer les propriétés électrophysiologiques des neurones, sur la base de leurs propriétés morphologiques, mais elle ne nous permet pas de conclure sur la physiologie de chacune des cellules reconstruites. Pour y parvenir, il faudrait effectuer des enregistrements électrophysiologiques pour chacun de ces neurones ou déterminer leur composition biochimique. Il a d'ailleurs été démontré que les propriétés physiologiques des neurones pyramidaux de la couche 5 pouvaient être influencées par la distribution des récepteurs

au glutamate de type N-Methyl-D-aspartate (NMDA) dans les différents compartiments dendritiques (Rhodes 2006; Schiller et al. 2000), et selon la conductance de ces récepteurs (Martell et al. 2012).

6.3.1.1 *Un continuum de morphologies*

Lors de l'analyse des composantes principales, nous avons trouvé que le volume des différents compartiments dendritiques constituait le facteur qui contribuait à la première composante principale. En classant les neurones, selon leurs volumes dendritiques, un continuum de morphologies a été observé.

L'origine de ce continuum de neurones qui projettent tous vers le cortex visuel primaire est inconnue. Cependant, il est possible que des mécanismes développementaux soient impliqués. Pendant le développement, l'arbre dendritique est façonné progressivement à partir d'une structure simple par la croissance et l'ajout de branches dendritiques. Les facteurs qui contribuent le plus dans la première composante principale sont les mêmes qui contribuent au développement des arborisations dendritiques. Puisque l'expérience sensorielle affecte la maturation de cet arbre dendritique (Callaway & Borrell 2011), on pourrait s'attendre à ce que les différents niveaux d'activité retrouvés dans diverses régions corticales façonnent les arbres dendritiques de manière différente et produisent ce continuum de morphologie neuronale.

La diversité morphologique observée chez l'adulte pourrait donc provenir de ces mécanismes développementaux. Ces mécanismes pourraient aussi être à la base des différences observées entre les connexions descendantes qui proviennent des différentes aires sensorielles étudiées.

6.4 Les circuits corticaux

Dans cette thèse, nous avons étudié les connexions afférentes et efférentes du cortex visuel primaire. Nous avons démontré que des connexions directes et indirectes

pouvaient lier les différentes aires sensorielles. Nous avons montré que les connexions indirectes s'effectuent directement sur le neurone de projection vers la cible corticale, ce qui implique qu'elles peuvent être rapides et suggère qu'elles pourraient être impliquées dans la synchronisation des interactions multimodales. Nous avons démontré que les connexions cortico-corticales directes étaient constituées d'une population neuronale hétérogène, ce qui suggère que chacune des connexions peut avoir plus d'une fonction. Nous avons aussi étudié les différents facteurs qui sont impliqués dans la mise en place de circuits fonctionnels et nous avons démontré que leur développement normal dépend de l'expérience sensorielle.

6.4.1 Un modèle théorique de l'architecture corticale

Les résultats obtenus dans cette thèse pourront être intégrés dans un modèle qui décrit l'organisation des réseaux corticaux dans une perspective différente de l'organisation hiérarchique (Sporns 2011a). Dans ce modèle (Figure 6.4), il est proposé que le cortex cérébral soit formé de modules et de relais (*hubs*). Les modules formeraient des ensembles fonctionnels constitués de groupes de neurones ou d'aires corticales associés à une fonction particulière, comme le traitement d'informations visuelles, alors que les aires relais permettraient de lier différents modules. Ce modèle peut être appliqué à grande échelle, afin d'étudier la connectivité cortico-corticale sur l'ensemble du cortex cérébral, ou à petite échelle, pour étudier l'organisation cortico-corticale à l'intérieur même d'un module. À l'échelle de tout le cortex, les aires associatives multimodales pourraient correspondre aux aires relais puisqu'elles sont la cible de toutes les voies sensorielles ascendantes (Sporns 2011a). Les modules pourraient, quant à eux, correspondre au cortex occipital (vision), temporal (audition) et pariétal (somesthésie). À plus petite échelle, les aires corticales qui font partie d'un module et qui participent aussi à des connexions cortico-corticales multimodales, pourraient former des aires relais. Par exemple, il pourrait s'agir des aires retrouvées en périphérie des aires primaires qui sont des cibles d'afférences multimodales (Paperna & Malach 1991) et où des interactions multimodales ont été enregistrées (Wallace et al. 2004).

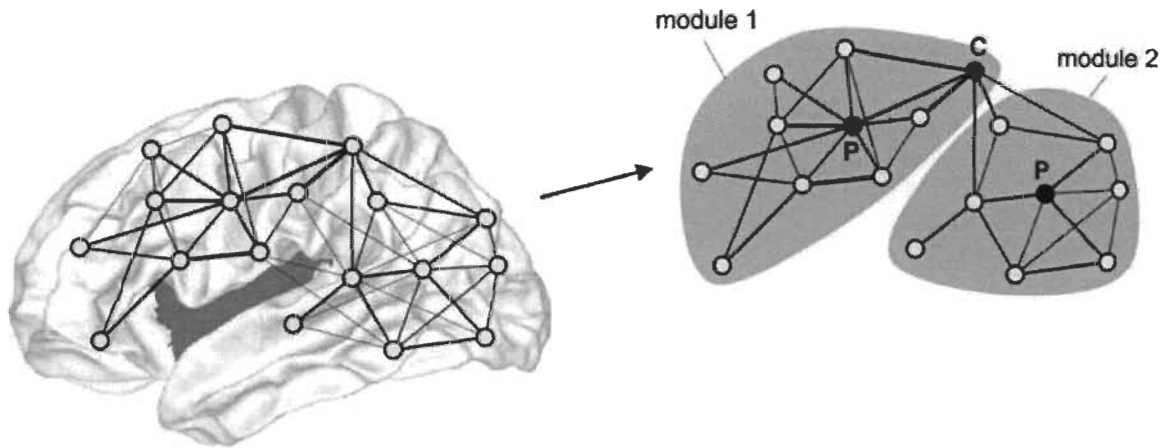


Figure 6.4 Le cortex cérébral, un réseau d'aires corticales.

Le cortex cérébral est constitué de plusieurs aires corticales qui sont reliées les unes avec les autres par des connexions cortico-corticales plus ou moins denses. Les aires fortement interconnectées (fortement corrélées) peuvent être regroupées en modules. Ces modules pourraient être reliés par des aires relais (C) (Sporns 2011b).

Chez la souris, il a été proposé que les voies ventrales et dorsales forment des modules corticaux (Wang et al. 2012). Les aires antérolatérale et latéromédiale, respectivement impliquées dans les voies dorsale et ventrale, sont les principales cibles du cortex visuel primaire et ces deux aires sont aussi fortement interconnectées (voir Figure 1.6) (Wang et al. 2011; 2012). Cette connexion pourrait permettre à l'aire antérolatérale d'acheminer de l'information depuis le cortex visuel primaire vers la voie ventrale et à l'aire latéromédiale de transférer de l'information visuelle vers la voie dorsale. Les aires antérolatérale et latéromédiale pourraient donc agir en tant que relais entre le cortex visuel primaire et l'autre module cortical.

Des zones de convergence multisensorielles dans les aires corticales en périphérie des aires sensorielles primaires ont déjà été décrites chez le rat (Paperna & Malach 1991). Cependant, la microstructure de ces circuits n'était pas connue. Dans le cadre de la deuxième étude présentée dans cette thèse, nous avons montré que l'aire visuelle secondaire latérale assure la mise en place d'une connexion indirecte entre les aires auditive et visuelle primaires. Les neurones qui ont été étudiés proviennent très probablement des régions antérolatérales et latéromédiales. Ceci pourrait donc signifier

qu'en plus d'assurer une fonction de relais entre les voies visuelles, ces aires extrastrées pourraient aussi agir en tant que relais pour transférer rapidement de l'information multimodale entre les modules auditif et visuel.

Pour construire leur modèle, l'équipe de Sporns a utilisé la densité de connexion entre les aires corticales pour regrouper les aires fortement connectées en modules. Ce modèle tient donc uniquement compte des réseaux d'axones liant deux aires corticales (Figure 6.4). Bien que ce modèle d'organisation du cortex cérébral soit très instructif, il ne permet pas d'apprécier l'organisation des circuits corticaux à l'échelle cellulaire. Cette information est pourtant nécessaire pour comprendre l'algorithme d'analyse effectué par le cortex cérébral.

Il est bien connu que les connexions *feedforward* et *feedback* proviennent d'une population de neurones localisés respectivement dans les couches supragranulaires et infragranulaires (Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979) et que leurs axones peuvent aussi cibler plusieurs couches corticales, tel que démontré par des études anatomiques (Coogan & Burkhalter 1990; Felleman & Van Essen 1991; Rockland & Pandya 1979) et électrophysiologiques (Givre et al. 1994; Schroeder et al. 1998). Ces deux types de connexions peuvent aussi adopter des propriétés inductrices et modulatrices (Covic & Sherman 2011; De Pasquale & Sherman 2011). Dans la seconde étude présentée dans cette thèse, nous avons montré que les neurones qui participent aux connexions indirectes pourraient former un sous-ensemble de neurones dans le cortex visuel secondaire latéral. Dans la dernière étude, nous avons montré que les neurones qui participent aux connexions *feedback* ont un éventail de morphologies dendritiques et que les connexions qui proviennent de différentes aires sensorielles ne sont pas identiques.

Nos résultats, et ceux d'études antérieures, démontrent donc que ces circuits sont hétérogènes, tant sur le plan anatomique que fonctionnel. Pour construire un modèle d'organisation des circuits corticaux représentatif de la réalité et pour être en mesure de vraiment comprendre les effets exercés par chacune des connexions cortico-corticales sur l'aire qui les reçoit, il est donc nécessaire de déterminer la composition de ces circuits à l'échelle cellulaire.

6.4.2 Les particularités de la souris

La souris est un modèle intéressant pour étudier la structure des circuits corticaux, mais des différences importantes doivent être prises en considération lors de l'interprétation des résultats. Par exemple, la souris se distingue du primate par la quantité d'aires corticales (Kaas 2011). Ces différences pourraient être le résultat de l'évolution du néocortex.

Un accroissement de la taille de l'encéphale a été observé au cours de l'évolution. Un plus grand volume cortical résulte nécessairement en une plus grande distance entre les structures et donc de la quantité de fibres. Dans ce contexte, les fibres doivent être myélinisées pour assurer une vitesse de conduction rapide. Ceci pourrait causer un encombrement de la boîte crânienne par de la matière blanche et limiter le développement de la matière grise.

Une solution pour optimiser l'espace disponible a donc été de segmenter les aires corticales en plusieurs régions qui reçoivent des afférences similaires et qui sont spécialisées dans le traitement d'une portion de l'information sensorielle (Krubitzer 1995). L'évolution de la taille des cerveaux a donc été associée à une augmentation du nombre d'aires corticales. Par exemple, on retrouve plus de trente aires corticales impliquées dans le système visuel du primate (Felleman & Van Essen 1991), alors qu'il n'y en aurait que neuf chez la souris (Wang & Burkhalter 2007). Les aires associatives, qui assurent un traitement plus complexe de l'information (voir section 1.3.1), se seraient aussi développées davantage de cette manière chez le primate.

6.4.3 Les circuits corticaux et la perception sensorielle

Les connexions qui ont été étudiées dans cette thèse permettent de lier des aires de modalité sensorielle différente qui sont impliquées dans la construction d'un percept sensoriel.

La perception sensorielle dépend de la structure et des propriétés fonctionnelles des champs récepteurs, puisque ce sont eux qui déterminent si un neurone répond au stimulus qui leur est présenté. Un champ récepteur est constitué d'une région centrale et d'un pourtour et ces deux régions, qui ont un effet antagoniste l'une sur l'autre, sont la cible de connexions distinctes (Allman et al. 1985; Angelucci & Bressloff 2006; Angelucci et al. 2002; Ichida et al. 2007; Schwabe et al. 2006). Les connexions de type *feedforward* contribuent au développement des champs récepteurs dans les aires de niveau hiérarchique supérieur, alors que les connexions de type *feedback* et les connexions horizontales donnent naissance à des connexions récurrentes qui modulent les propriétés de ces champs récepteurs en affectant principalement leur pourtour (Figure 6.5) (Angelucci & Bressloff 2006).

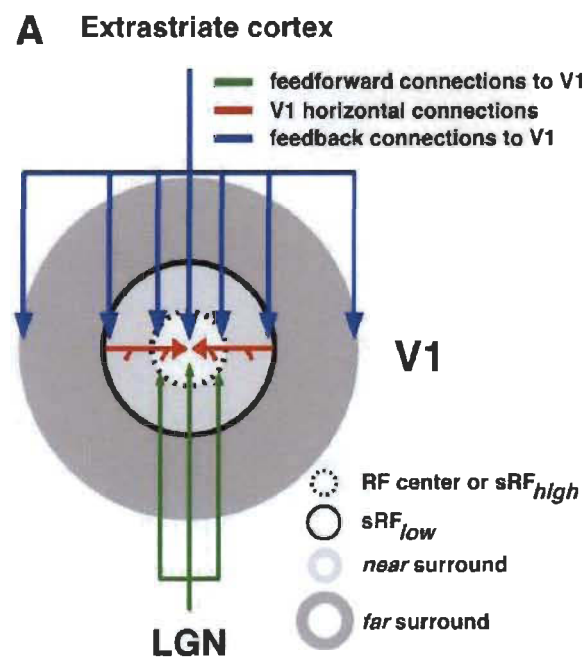


Figure 6.5 Les champs récepteurs et les connexions corticales.

Dans le cortex visuel primaire (V1), le champ récepteur des neurones est la cible de connexions *feedforward* et *feedback*. Les connexions *feedforward* proviennent du noyau géniculé latérodorsal du thalamus (LGN). Ces connexions ciblent la portion centrale du champ récepteur. Les connexions *feedback*, qui proviennent des aires extrastriées, ciblent plutôt le pourtour du champ récepteur. Des connexions latérales, qui proviennent d'autres neurones du cortex visuel primaire, vont aussi ajuster la réponse du neurone en modulant les propriétés de son champ récepteur (Ichida et al. 2007).

Nous avons montré que les connexions de type *feedforward* se développent même en absence d'afférences sensorielles, mais que la topographie de ces connexions était altérée. Puisque les connexions *feedforward* assurent la mise en place des champs récepteurs, des champs récepteurs pourraient se développer dans les aires visuelles extrastriées des souris aveugles. Cependant, puisque la topographie des connexions *feedforward* est anormale chez ces animaux, la structure de ces champs récepteurs pourrait être altérée. Il n'est pas possible de vérifier les propriétés physiologiques des neurones visuels chez des animaux énucléés et anophtalmes en utilisant des enregistrements électrophysiologiques lors de stimulations visuelles. L'état de leurs champs récepteurs est donc inconnu. Cependant, des études effectuées chez des rats (Fagiolini et al. 1994) et des singes (Regal et al. 1976) adultes, qui ont été élevés dans le noir, ont montré que les champs récepteurs des neurones du cortex visuel sont anormalement larges et que les animaux possèdent une faible acuité visuelle.

Nous avons démontré que les connexions *feedback* qui proviennent des aires visuelles secondaires médiales et latérales et des aires auditives et somesthésiques ne sont pas identiques, mais qu'elles sont toutes constituées à partir de neurones pyramidaux de la couche 5 aux morphologies variées.

Les connexions *feedback* permettent de moduler l'information sensorielle en considérant l'intégralité d'un stimulus (Angelucci et al. 2002). Les connexions descendantes multimodales caractérisées dans cette thèse pourraient donc modifier le percept sensoriel qui se développe dans le cortex visuel primaire lors de la présentation d'un stimulus multimodal. De plus, les connexions descendantes étudiées dans cette thèse pourraient assurer un transfert rapide d'information vers le cortex visuel primaire. Comme la synchronie entre les différents stimuli est requise pour que le stimulus multisensoriel soit intégré (Stein & Stanford 2008), ces connexions pourraient participer à la construction d'un percept multisensoriel au niveau du cortex visuel primaire.

6.4.3.1 *Les modèles de perception sensorielle consciente*

Il existe un débat dans la littérature sur le rôle des connexions *feedback* et du *top-down* dans la construction de processus cognitifs, comme la perception sensorielle consciente. Depuis environ une vingtaine d'années, différents modèles ont été proposés, mais le fonctionnement de ces processus est toujours mal compris.

Le premier modèle qui a été proposé pour expliquer la perception sensorielle consciente, le modèle hiérarchique classique, suggère que seules les aires corticales qui ont des connexions directes avec les aires situées dans le lobe frontal seraient en mesure de participer à l'élaboration d'un percept sensoriel conscient (Crick & Koch 1995). Le cortex frontal est effectivement considéré comme étant le siège de nombreux processus cognitifs (Rees et al. 2002), puisqu'il est constitué d'un ensemble d'aires corticales interconnectées et reliées aux aires sensorielles de niveau hiérarchique supérieur (Figure 6.6).

Puisque seules les aires sensorielles de niveau hiérarchique supérieur sont directement interconnectées avec le cortex frontal (Miller 2000; Yeterian et al. 2012), il a été proposé que ces aires soient impliquées dans la perception sensorielle consciente (Rees et al. 2002). Ainsi, les aires sensorielles primaires serviraient principalement à transférer l'information, par des connexions ascendantes, vers les aires situées au sommet de la hiérarchie corticale. Selon ce modèle, les connexions descendantes vers des aires de plus bas niveau hiérarchique serviraient, quant à elles, à sélectionner l'information pertinente dans le signal entrant pour la construction du percept sensoriel conscient (Tong 2003).

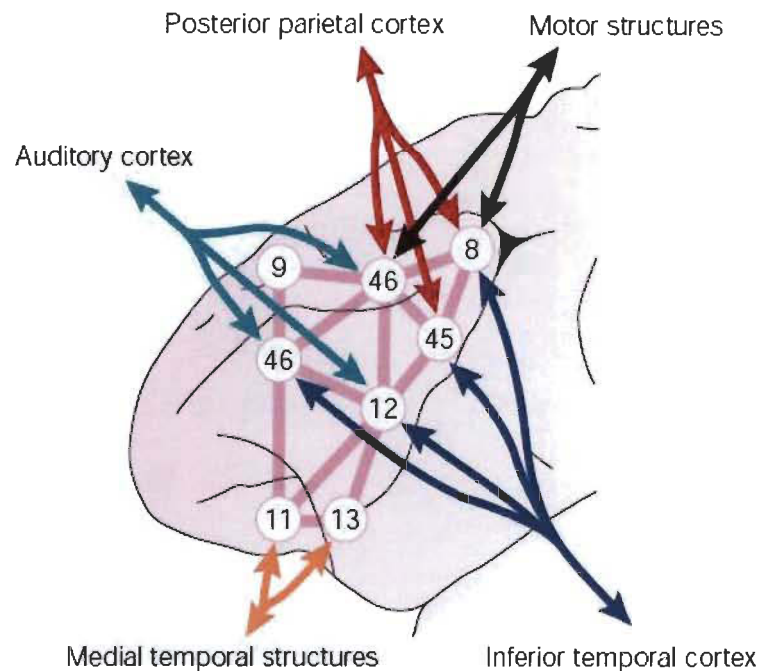


Figure 6.6 Les connexions corticales et le lobe frontal.

Le lobe frontal est formé d'un ensemble d'aires corticales. Sur cette figure, seules quelques-unes d'entre elles sont représentées (numéros). Ces aires sont interreliées avec des aires sensorielles de niveau hiérarchique supérieur (Miller 2000).

Certaines études ont cependant démontré que les connexions descendantes vers les aires de niveau hiérarchique inférieur pouvaient être impliquées dans certains aspects de la perception consciente. Ceci a principalement été démontré dans le cas du système visuel, mais ce principe pourrait s'appliquer aux autres modalités sensorielles (Meyer 2011). Ces études supportent donc un modèle où les connexions descendantes sont nécessaires à la perception sensorielle consciente et où les aires sensorielles primaires sont au sommet d'une hiérarchie corticale inversée.

Différents exemples ont été utilisés pour valider ce modèle. L'un d'entre eux est le « *figure-ground percept* » (Figure 6.7). Dans cet exemple, un contour apparaît à la jonction des lignes d'orientation orthogonale. Ce contour délimite une figure, ici un carré, présenté sur un fond. Lorsque le champ récepteur d'un neurone correspond avec le fond de l'image, ce neurone décharge avec une certaine intensité. Dans le cas d'un

neurone dont le champ récepteur du neurone correspond au contour, sa réponse est initialement identique à celle du neurone dont le champ récepteur correspond au fond, puis elle devient significativement plus forte après environ 80ms. Dans le cas d'un neurone dont le champ récepteur correspond plutôt avec le centre de la figure, la réponse est initialement identique à celle du neurone dont le champ récepteur correspond au fond de l'image, puis son niveau d'activité augmente après environ 100ms pour atteindre une intensité similaire à celle du neurone dont le champ récepteur correspond au contour. Le tout fait en sorte que le carré apparaît comme surélevé par rapport au fond (Lamme et al. 1998).

À cause du délai de réponse et parce qu'il s'agit d'un exemple de perception contextuelle, où l'ensemble du stimulus doit être pris en considération pour créer le percept sensoriel, la réponse sélective à la figure nécessite probablement l'implication de connexions récurrentes. Une lésion des aires extrastriées réduit la réponse spécifique à la figure qui devient similaire à celle du fond (Hupe et al. 1998; Pascual-Leone & Walsh 2001; Ro et al. 2003; Sterzer et al. 2006; Super et al. 2001), ce qui démontre l'importance des connexions *feedback* en provenance des aires extrastriées dans ce phénomène.

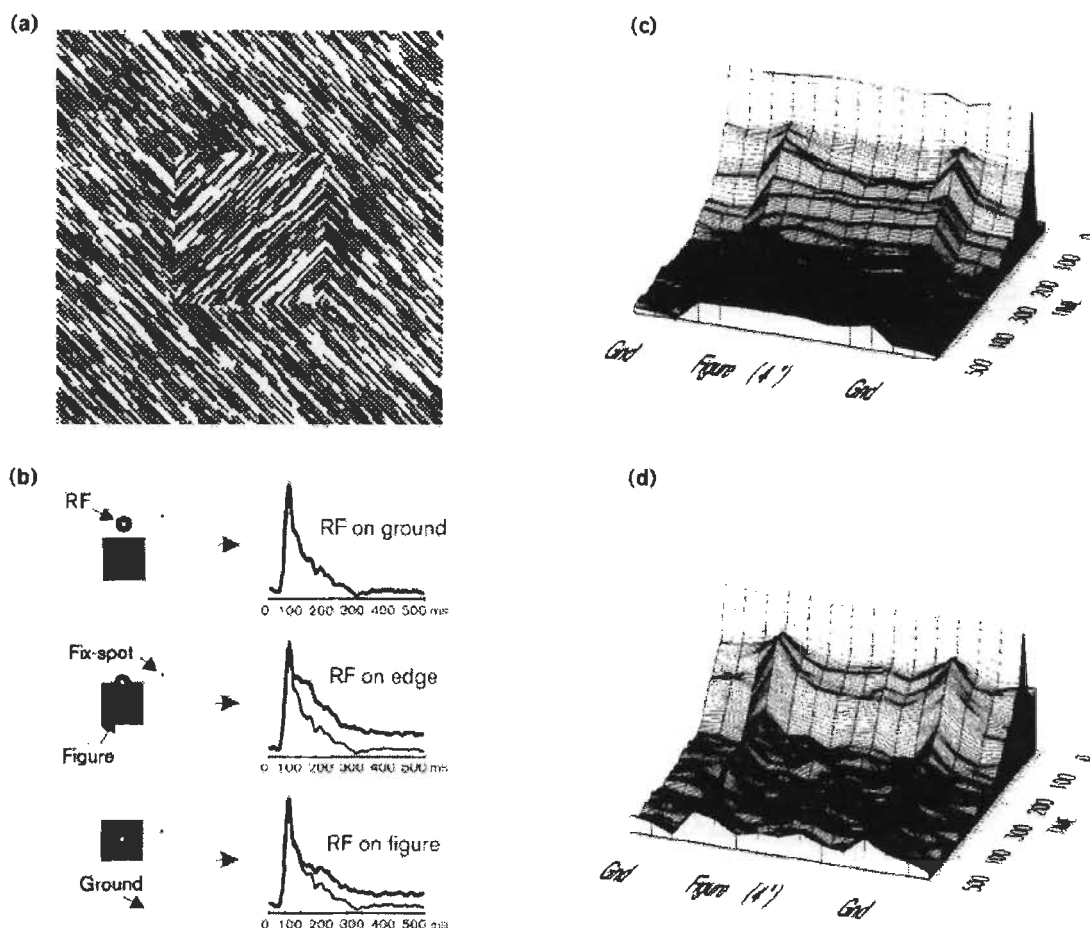


Figure 6.7 La discrimination « figure-ground ».

A) Une figure formée de lignes obliques est incorporée à un fond constitué de lignes d'orientation orthogonales. B) En haut, le champ récepteur de neurones du cortex visuel primaire est aligné sur le fond de l'image. Au centre, le champ récepteur est maintenant aligné sur le contour. Lorsque la réponse neuronale est comparée à celle du fond seulement, il est clair qu'à environ 80 ms après le stimulus, la réponse de la bordure est plus élevée que celle du fond seulement. En bas, la réponse est enregistrée lorsque leur champ récepteur est aligné sur la figure seulement. Dans ce cas-ci, la réponse diffère de celle du fond à partir d'environ 100 ms après le stimulus. C) Le champ récepteur est déplacé et la réponse est comparée pour 15 positions. L'axe des x représente la position du champ récepteur, l'axe des y indique le temps post-stimulus et l'axe vertical représente l'intensité de la réponse. La réponse pour le contour apparaît à 80 ms, alors que la réponse pour la figure apparaît à 100 ms. D) Même chose qu'en C, mais chez un animal ayant subi une lésion au niveau des aires extrastriées. Notez l'absence de réponse pour le centre de la figure (Lamme et al. 1998).

Un autre exemple qui semble valider le modèle hiérarchique inversé est le «*priming*». Dans cet exemple, les connexions ascendantes entre les aires corticales visuelles permettent de détecter un ensemble de taches noires disposées de manière aléatoire sur un fond blanc (Figure 6.8).



Figure 6.8 Les voies descendantes et la perception.

Les voies ascendantes permettent de détecter un amas de taches, mais ne permettent pas de voir l'image qui s'y cache. Celle-ci devient évidente si l'observateur connaît l'image (voir Figure 6.9) (Gregory 1970).

Pour un observateur naïf, il est presque impossible de détecter l'image cachée dans cet amas de taches. Cependant, si cet observateur prend conscience de l'image (Figure 6.9) et qu'il regarde à nouveau la première figure (Figure 6.8), l'image cachée devient immédiatement évidente.

Selon ce modèle, les connexions descendantes permettraient d'augmenter la saillance des informations pertinentes à la perception du stimulus dans les aires de niveau hiérarchique inférieur; ces aires seraient donc au sommet d'une hiérarchie corticale inversée (Lamme & Spekreijse 2000).



Figure 6.9 Les voies descendantes et la perception (partie 2).

Un contour a été tracé sur l'image précédente. Ce contour, qui révèle un dalmatien reniflant le sol, est suffisant pour que l'image complète devienne évidente. En effet, avec ce seul contour, il est maintenant possible de percevoir un arbre dans le coin supérieur droit et de distinguer les ombres.

Les résultats qui ont été obtenus dans cette thèse ne permettront pas de valider l'un ou l'autre de ces modèles, mais ils permettront de mieux comprendre comment les circuits corticaux sont organisés pour traiter l'information sensorielle et construire un percept sensoriel.

Nous avons montré que l'expérience sensorielle est nécessaire à la mise en place d'une connexion striée-extrastrisée normale. Si la voie *bottom-up* assure la construction d'un percept sensoriel conscient dans les aires situées au sommet de la hiérarchie corticale, les résultats que nous avons obtenus pourraient suggérer que l'expérience sensorielle est nécessaire à la mise en place de circuits corticaux impliqués dans ce processus cognitif. Une désorganisation de ces circuits, par un traumatisme ou une déprivation sensorielle, pourrait donc entraîner différents troubles cognitifs. Nous avons aussi montré que les connexions *feedback* vers le cortex visuel primaire sont formées par des neurones pyramidaux de la couche 5 qui possèdent un éventail de morphologies dendritiques. Si la perception sensorielle consciente n'émerge qu'au niveau des aires de

haut niveau hiérarchique, les connexions *feedback* qui ont été étudiées dans cette thèse pourraient moduler l'activité dans le cortex visuel primaire. Ceci pourrait permettre d'ajuster l'analyse effectuée dans cette aire lors du traitement de l'information ascendante. Si la perception sensorielle consciente émerge plutôt dans les aires sensorielles primaires, ces connexions pourraient alors avoir un rôle direct dans la construction d'un percept multisensoriel conscient.

6.4.3.2 *La souris comme modèle de perception sensorielle consciente*

Dans cette thèse, nous avons utilisé la souris comme modèle animal pour l'étude des circuits corticaux. Nous avons fait un parallèle entre l'organisation de ces circuits et la perception sensorielle consciente. Il est pour l'instant difficile de statuer sur l'état de conscience chez la souris, alors que son site et ses principes de base sont toujours méconnus chez le primate (voir section 6.4.3.1).

Plusieurs groupes de recherche travaillent actuellement à déterminer le site et les substrats anatomiques requis pour l'émergence de la conscience. Une des pistes étudiées concerne les patrons oscillatoires qui se développent entre les régions corticales lors de la présentation d'un stimulus. L'importance de ces oscillations dans la perception sensorielle consciente a été considérée pour la première fois à la fin des années 1980. Il avait alors été remarqué que deux neurones d'aires distinctes impliquées dans le traitement d'informations visuelles oscillent de manière synchrone suite à la présentation du stimulus visuel chez le chat (Eckhorn et al. 1988; Gray & Singer 1989). Cette oscillation s'effectue à une fréquence d'environ 40Hz, correspondant à la bande des fréquences gamma. Il a ensuite été proposé que cette synchronie permet de lier les neurones pour l'élaboration d'une réponse cohérente, nécessaire à la perception consciente (Crick & Koch 1990; 1992). Chez le rat, il a d'ailleurs été démontré qu'une anesthésie, qui induit une perte de conscience, altère les oscillations gamma entre les aires corticales normalement synchronisées lors d'une stimulation visuelle (Imas et al. 2005).

Chez l'humain, les oscillations gamma sont présentes lorsqu'un stimulus est perçu par l'individu. Ceci a été démontré dans le cas de stimulations visuelles (Basar-Eroglu et al. 1996; Beauchamp et al. 2012; Laczó et al. 2011), auditives (Luo & Poeppel 2012) et somesthésique (Zhang et al. 2012). Pour déterminer que le stimulus était perçu, l'individu devait en informer l'expérimentateur.

Des oscillations gamma ont aussi été observées chez le singe (Lima et al. 2011; Panagiotaropoulos et al. 2012), le chat (Eckhorn et al. 1988; Engel et al. 1990; 1991; Fries et al. 1997; Gray & Singer 1989; Konig et al. 1995; Roelfsema et al. 1997), le rat (Imas et al. 2005; Ogawa et al. 2011) et la souris (Nase et al. 2003). Bien que des tâches comportementales soient généralement utilisées pour vérifier la correspondance entre la présence de ces oscillations et la perception sensorielle consciente, ce lien ne peut qu'être supposé car l'animal ne peut pas indiquer clairement à l'expérimentateur qu'il a effectivement perçu le stimulus. De nouvelles techniques devront donc être utilisées pour être en mesure de déterminer le type de conscience, son niveau et son site chez les différents modèles animaux, dont la souris.

CHAPITRE VII

CONCLUSION

Dans cette thèse, la structure de ces circuits afférents et efférents du cortex visuel primaire a été étudiée à l'échelle cellulaire. Le but principal était de déterminer quels facteurs sont responsables de la mise en place de ces circuits corticaux et de leur organisation microstructurale.

Nous avons étudié la distribution topographique des connexions striées-extrastriées et l'organisation de ces circuits chez l'animal aveugle. Nous avons montré que cette topographie était altérée de manière plus importante chez la souris anophtalme que la souris énucléée. Ces résultats suggèrent que la rétine possède un rôle structurant pour l'organisation de ces circuits.

Nous avons aussi démontré que des zones de convergence dans les régions en périphérie des aires sensorielles primaires pouvaient donner naissance à des voies multimodales indirectes. Ceci n'avait jamais été démontré. Dans cette étude, nous avons aussi démontré que la connexion indirecte entre les cortex auditif et visuel primaires se développe même en absence d'expérience visuelle. Des réorganisations microstructurales ont cependant été observées chez les souris aveugles.

Nous avons finalement démontré que les voies afférentes multimodales directes sont hétérogènes et que les facteurs documentés dans la littérature, soit la hiérarchie corticale, la modalité sensorielle et la latéralité, n'influençaient pas la structure de ces connexions. Nous n'avons pas été en mesure d'identifier des groupes distincts dans la population neuronale participant à ces connexions. La cible corticale pourrait donc représenter un facteur déterminant pour la composition de ces connexions en types cellulaires.

Ces résultats démontrent une importante complexité dans la microstructure des circuits corticaux. Les informations recueillies dans cette thèse contribueront à l'élaboration de modèles théoriques de l'organisation de la connectivité corticale, qui devront tenir compte de l'hétérogénéité morphologique retrouvée dans les différents circuits corticaux. Ces informations sont nécessaires à la compréhension de la communication entre les aires corticales sensorielles afin de construire un percept (multi)sensoriel. Ces résultats pourront aussi s'inscrire dans les différents modèles de perception sensorielle consciente.

Les résultats obtenus dans cette thèse ont aussi démontré la nécessité de caractériser l'organisation de ces circuits à l'échelle cellulaire lors d'études de déprivation sensorielle. Une connexion à l'apparence inchangée pourrait avoir une fonction différente suite à un traumatisme.

RÉFÉRENCES

Abel, P. L., Olavarria, J. F. (1996) "The callosal pattern in striate cortex is more patchy in monocularly enucleated albino than pigmented rats", *Neurosci. Lett.* 204: 169-172.

Akerman, C. J., Tolhurst, D. J., Morgan, J. E. et al. (2003) "Relay of visual information to the lateral geniculate nucleus and the visual cortex in albino ferrets", *J. Comp Neurol.* 461: 217-235.

Allen Brain Institute for Brain Science. 2012. [En ligne]. <<http://www.brain-map.org/>>. Consulté le 02 Octobre 2012

Allman, B. L., Bittencourt-Navarrete, R. E., Keniston, L. P. et al. (2008) "Do cross-modal projections always result in multisensory integration?", *Cereb. Cortex* 18: 2066-2076.

Allman, B. L., Keniston, L. P., Meredith, M. A. (2009) "Not just for bimodal neurons anymore: the contribution of unimodal neurons to cortical multisensory processing", *Brain Topogr.* 21: 157-167.

Allman, B. L., Meredith, M. A. (2007) "Multisensory processing in "unimodal" neurons: cross-modal subthreshold auditory effects in cat extrastriate visual cortex", *J. Neurophysiol.* 98: 545-549.

Allman, J., Miezin, F., McGuinness, E. (1985) "Stimulus specific responses from beyond the classical receptive field: neurophysiological mechanisms for local-global comparisons in visual neurons", *Annu. Rev. Neurosci.* 8: 407-430.

Andermann, M. L., Kerlin, A. M., Roumis, D. K. et al. (2011) "Functional specialization of mouse higher visual cortical areas", *Neuron* 72: 1025-1039.

Angelucci, A., Bressloff, P. C. (2006) "Contribution of feedforward, lateral and feedback connections to the classical receptive field center and extra-classical receptive field surround of primate V1 neurons", *Prog. Brain Res.* 154: 93-120.

Angelucci, A., Levitt, J. B., Walton, E. J. et al. (2002) "Circuits for local and global signal integration in primary visual cortex", *J. Neurosci.* 22: 8633-8646.

Bai, W. Z., Ishida, M., Arimatsu, Y. (2004) "Chemically defined feedback connections from infragranular layers of sensory association cortices in the rat", *Neuroscience* 123: 257-267.

Bansal, A., Singer, J. H., Hwang, B. J. et al. (2000) "Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal waves in forming ON and OFF circuits in the inner retina", *J. Neurosci.* 20: 7672-7681.

Basar-Eroglu, C., Struber, D., Kruse, P. et al. (1996) "Frontal gamma-band enhancement during multistable visual perception", *Int. J. Psychophysiol.* 24: 113-125.

Bavelier, D., Neville, H. J. (2002) "Cross-modal plasticity: where and how?", *Nat. Rev. Neurosci* 3: 443-452.

Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2002) "Neuroscience, à la découverte du cerveau", 2 éd. Éditions Pradel, Rueil-Malmaison, France.

Beauchamp, M. S., Sun, P., Baum, S. H. et al. (2012) "Electrocorticography links human temporoparietal junction to visual perception", *Nat. Neurosci.* 15: 957-959.

Beaulieu-Lefebvre, M., Schneider, F. C., Kupers, R. et al. (2011) "Odor perception and odor awareness in congenital blindness", *Brain Res. Bull.* 84: 206-209.

Beer, A. L., Plank, T., Greenlee, M. W. (2011) "Diffusion tensor imaging shows white matter tracts between human auditory and visual cortex", *Exp. Brain Res.* 213: 299-308.

Benavides-Piccione, R., Hamzei-Sichani, F., Ballesteros-Yanez, I. et al. (2006) "Dendritic size of pyramidal neurons differs among mouse cortical regions", *Cereb. Cortex* 16: 990-1001.

Bishop, K. M., Goudreau, G., O'Leary, D. D. (2000) "Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*", *Science* 288: 344-349.

Bishop, K. M., Rubenstein, J. L., O'Leary, D. D. (2002) "Distinct actions of *Emx1*, *Emx2*, and *Pax6* in regulating the specification of areas in the developing neocortex", *J Neurosci* 22: 7627-7638.

Bizley, J. K., King, A. J. (2008) "Visual-auditory spatial processing in auditory cortical neurons", *Brain Res.* 1242: 24-36.

Bizley, J. K., King, A. J. (2009) "Visual influences on ferret auditory cortex", *Hear. Res.* 258: 55-63.

Bizley, J. K., Nodal, F. R., Bajo, V. M. et al. (2007) "Physiological and anatomical evidence for multisensory interactions in auditory cortex", *Cereb. Cortex* 17: 2172-2189.

Bock, A. S., Kroenke, C. D., Taber, E. N. et al. (2012) "Retinal input influences the size and corticocortical connectivity of visual cortex during postnatal development in the ferret", *J. Comp Neurol.* 520: 914-932.

Boire, D., Morris, R., Ptito, M. et al. (1995) "Effects of neonatal splitting of the optic chiasm on the development of feline visual callosal connections", *Exp. Brain Res.* 104: 275-286.

Borra, E., Rockland, K. S. (2011) "Projections to early visual areas v1 and v2 in the calcarine fissure from parietal association areas in the macaque", *Front Neuroanat.* 5: 35.

Bourdet, C., Olavarria, J. F., Van Sluyters, R. C. (1996) "Distribution of visual callosal neurons in normal and strabismic cats", *J. Comp Neurol.* 366: 259-269.

Bravo, H., Inzunza, O. (1994) "Effect of pre- and postnatal retinal deprivation on the striate-peristriate cortical connections in the rat", *Biol Res* 27: 73-77.

Bravo, H., Olavarria, J., Martinich, S. (1990a) "Patterns of interhemispheric and striate-peristriate connections in visual cortex of the South American marsupial *Marmosa elegans* (mouse opossum)", *Anat. Embryol. (Berl)* 182: 583-589.

Bravo, H., Olavarria, J., Torrealba, F. (1990b) "Comparative study of visual inter and intrahemispheric cortico-cortical connections in five native Chilean rodents", *Anat. Embryol. (Berl)* 181: 67-73.

Brodal, P. (2010) "The central nervous system: Structure and function", 4e éd. Oxford University Press, Oslo, Norvège.

Bruce, C. J., Goldberg, M. E. (1985) "Primate frontal eye fields. I. Single neurons discharging before saccades", *J. Neurophysiol.* 53: 603-635.

Bruce, C. J., Goldberg, M. E., Bushnell, M. C. et al. (1985) "Primate frontal eye fields. II. Physiological and anatomical correlates of electrically evoked eye movements", *J. Neurophysiol.* 54: 714-734.

Bryant, C. D. (2011) "The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1245: 31-33.

Bullier, J. (2001) "Integrated model of visual processing", *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36: 96-107.

Burton, H., Snyder, A. Z., Conturo, T. E. et al. (2002a) "Adaptive changes in early and late blind: a fMRI study of Braille reading", *J. Neurophysiol.* 87: 589-607.

Burton, H., Snyder, A. Z., Diamond, J. B. et al. (2002b) "Adaptive changes in early and late blind: a fMRI study of verb generation to heard nouns", *J. Neurophysiol.* 88: 3359-3371.

Butts, D. A., Kanold, P. O., Shatz, C. J. (2007) "A burst-based "Hebbian" learning rule at retinogeniculate synapses links retinal waves to activity-dependent refinement", *PLoS Biol.* 5: e61.

Butts, D. A., Rokhsar, D. S. (2001) "The information content of spontaneous retinal waves", *J. Neurosci.* 21: 961-973.

Calderone, J. B., Jacobs, G. H. (1995) "Regional variations in the relative sensitivity to UV light in the mouse retina", *Vis. Neurosci.* 12: 463-468.

Callaway, E. M., Borrell, V. (2011) "Developmental sculpting of dendritic morphology of layer 4 neurons in visual cortex: influence of retinal input", *J Neurosci* 31: 7456-7470.

Campi, K. L., Bales, K. L., Grunewald, R. et al. (2010) "Connections of auditory and visual cortex in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*): evidence for multisensory processing in primary sensory areas", *Cereb. Cortex* 20: 89-108.

Castellani, V., Bolz, J. (1999) "Opposing roles for neurotrophin-3 in targeting and collateral formation of distinct sets of developing cortical neurons", *Development* 126: 3335-3345.

Castellani, V., Yue, Y., Gao, P. P. et al. (1998) "Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits", *J Neurosci* 18: 4663-4672.

Caviness, V. S. (1975) "Architectonic map of neocortex of the normal mouse", *J. Comp Neurol.* 164: 247-263.

Chabot, N., Charbonneau, V., Laramée, M. E. et al. (2008) "Subcortical auditory input to the primary visual cortex in anophthalmic mice", *Neurosci. Lett.* 433: 129-134.

Chabot, N., Robert, S., Tremblay, R. et al. (2007) "Audition differently activates the visual system in neonatally enucleated mice compared with anophthalmic mutants", *Eur. J. Neurosci.* 26: 2334-2348.

Chagnac-Amitai, Y., Luhmann, H. J., Prince, D. A. (1990) "Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features", *J. Comp Neurol.* 296: 598-613.

Chang, K., Van Sluyters, R. C., Olavarria, J. F. (1995) "Effect of monocular blockade of retinal activity on the development of visual callosal connections in the rat", *Biol. Res.* 28: 219-226.

Chapman, B. (2000) "Necessity for afferent activity to maintain eye-specific segregation in ferret lateral geniculate nucleus", *Science* 287: 2479-2482.

Chapman, B., Jacobson, M. D., Reiter, H. O. et al. (1986) "Ocular dominance shift in kitten visual cortex caused by imbalance in retinal electrical activity", *Nature* 324: 154-156.

Charbonneau, V., Laramée, M. E., Boucher, V. et al. (2012) "Cortical and subcortical projections to primary visual cortex in anophthalmic, enucleated and sighted mice", *Eur. J. Neurosci.* Accepted for publication.

Chase, H. B. (1942) "Studies on an Anophthalmic Strain of Mice. III. Results of Crosses with Other Strains", *Genetics* 27: 339-348.

Chase, H. B., Chase, E. B. (1941) "Studies on an anophthalmic strain of mice. I. Embryology of the eye region", *J. Morphol.* 68: 279-401.

Chen, C. C., Abrams, S., Pinhas, A. et al. (2009) "Morphological heterogeneity of layer VI neurons in mouse barrel cortex", *J. Comp Neurol.* 512: 726-746.

Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D. et al. (1995) "Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map", *Cell* 82: 371-381.

Cheng, X., Hsu, C. M., Curre, D. S. et al. (2006) "Central roles of the roof plate in telencephalic development and holoprosencephaly", *J. Neurosci.* 26: 7640-7649.

Clancy, B., Darlington, R. B., Finlay, B. L. (2001) "Translating developmental time across mammalian species", *Neuroscience* 105: 7-17.

Clarke, S., Miklossy, J. (1990) "Occipital cortex in man: organization of callosal connections, related myelo- and cytoarchitecture, and putative boundaries of functional visual areas", *J. Comp Neurol.* 298: 188-214.

Clavagnier, S., Falchier, A., Kennedy, H. (2004) "Long-distance feedback projections to area V1: implications for multisensory integration, spatial awareness, and visual consciousness", *Cogn Affect. Behav. Neurosci.* 4: 117-126.

Clemo, H. R., Sharma, G. K., Allman, B. L. et al. (2008) "Auditory projections to extrastriate visual cortex: connectional basis for multisensory processing in 'unimodal' visual neurons", *Exp. Brain Res.* 191: 37-47.

Cohen, L. G., Celnik, P., Pascual-Leone, A. et al. (1997) "Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans", *Nature* 389: 180-183.

Collignon, O., Vandewalle, G., Voss, P. et al. (2011) "Functional specialization for auditory-spatial processing in the occipital cortex of congenitally blind humans", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108: 4435-4440.

Conturo, T. E., Lori, N. F., Cull, T. S. et al. (1999) "Tracking neuronal fiber pathways in the living human brain", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 10422-10427.

Coogan, T. A., Burkhalter, A. (1990) "Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex", *Exp. Brain Res.* 80: 49-53.

Coogan, T. A., Burkhalter, A. (1993) "Hierarchical organization of areas in rat visual cortex", *J. Neurosci.* 13: 3749-3772.

Cook, P. M., Prusky, G., Ramoa, A. S. (1999) "The role of spontaneous retinal activity before eye opening in the maturation of form and function in the retinogeniculate pathway of the ferret", *Vis. Neurosci.* 16: 491-501.

Covic, E. N., Sherman, S. M. (2011) "Synaptic properties of connections between the primary and secondary auditory cortices in mice", *Cereb. Cortex* 21: 2425-2441.

Crick, F., Koch, C. (1990) "Some reflections on visual awareness", *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 55: 953-962.

Crick, F., Koch, C. (1992) "The problem of consciousness", *Sci Am.* 267: 152-159.

Crick, F., Koch, C. (1995) "Are we aware of neural activity in primary visual cortex?", *Nature* 375: 121-123.

Crossley, P. H., Martinez, S., Ohkubo, Y. et al. (2001) "Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles", *Neuroscience* 108: 183-206.

Cuevas, I., Plaza, P., Rombaux, P. et al. (2009) "Odour discrimination and identification are improved in early blindness", *Neuropsychologia* 47: 3079-3083.

De Lacoste, M. C., Kirkpatrick, J. B., Ross, E. D. (1985) "Topography of the human corpus callosum", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 578-591.

De Pasquale, R., Sherman, S. M. (2011) "Synaptic properties of corticocortical connections between the primary and secondary visual cortical areas in the mouse", *J. Neurosci.* 31: 16494-16506.

Desimone, R., Schein, S. J., Moran, J. et al. (1985) "Contour, color and shape analysis beyond the striate cortex", *Vision Res* 25: 441-452.

Despres, O., Candas, V., Dufour, A. (2005) "Spatial auditory compensation in early-blind humans: involvement of eye movements and/or attention orienting?", *Neuropsychologia* 43: 1955-1962.

Dhande, O. S., Bhatt, S., Anishchenko, A. et al. (2011a) "Role of adenylate cyclase 1 in retinofugal map development", *J. Comp Neurol.*

Dhande, O. S., Hua, E. W., Guh, E. et al. (2011b) "Development of single retinofugal axon arbors in normal and beta2 knock-out mice", *J. Neurosci.* 31: 3384-3399.

Diederich, A., Colonius, H. (2004) "Bimodal and trimodal multisensory enhancement: effects of stimulus onset and intensity on reaction time", *Percept. Psychophys.* 66: 1388-1404.

Doron, N., Wollberg, Z. (1994) "Cross-modal neuroplasticity in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*: a WGA-HRP tracing study", *Neuroreport* 5: 2697-2701.

Dougherty, R. F., Ben-Shachar, M., Bammer, R. et al. (2005a) "Functional organization of human occipital-callosal fiber tracts", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 7350-7355.

Dougherty, R. F., Ben-Shachar, M., Deutsch, G. et al. (2005b) "Occipital-callosal pathways in children: Validation and atlas development", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1064: 98-112.

Drager, U. C. (1975) "Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex", *J. Comp Neurol.* 160: 269-290.

Drager, U. C. (1978) "Observations on monocular deprivation in mice", *J. Neurophysiol.* 41: 28-42.

Drager, U. C., Olsen, J. F. (1980) "Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice", *J. Comp Neurol.* 191: 383-412.

Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C. et al. (1995) "In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases", *Cell* 82: 359-370.

Eckhorn, R., Bauer, R., Jordan, W. et al. (1988) "Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat", *Biol. Cybern.* 60: 121-130.

Elbert, T., Sterr, A., Rockstroh, B. et al. (2002) "Expansion of the tonotopic area in the auditory cortex of the blind", *J. Neurosci.* 22: 9941-9944.

Elston, G. N. (2002) "Cortical heterogeneity: implications for visual processing and polysensory integration", *J. Neurocytol.* 31: 317-335.

Elston GN. (2004) "Comparative studies of pyramidal neurons in visual cortex of monkeys" Chapitre 15, *The primate visual cortex*, 1re éd. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p 365-385.

Elston, G. N., Rosa, M. G. (1997) "The occipitoparietal pathway of the macaque monkey: comparison of pyramidal cell morphology in layer III of functionally related cortical visual areas", *Cereb. Cortex* 7: 432-452.

Elston, G. N., Rosa, M. G. (1998a) "Complex dendritic fields of pyramidal cells in the frontal eye field of the macaque monkey: comparison with parietal areas 7a and LIP", *Neuroreport* 9: 127-131.

Elston, G. N., Rosa, M. G. (1998b) "Morphological variation of layer III pyramidal neurones in the occipitotemporal pathway of the macaque monkey visual cortex", *Cereb. Cortex* 8: 278-294.

Elston, G. N., Rosa, M. G. (2000) "Pyramidal cells, patches, and cortical columns: a comparative study of infragranular neurons in TEO, TE, and the superior temporal polysensory area of the macaque monkey", *J. Neurosci.* 20: RC117.

Elston, G. N., Rosa, M. G., Calford, M. B. (1996) "Comparison of dendritic fields of layer III pyramidal neurons in striate and extrastriate visual areas of the marmoset: a Lucifer yellow intracellular injection", *Cereb. Cortex* 6: 807-813.

Engel, A. K., Konig, P., Gray, C. M. et al. (1990) "Stimulus-Dependent Neuronal Oscillations in Cat Visual Cortex: Inter-Columnar Interaction as Determined by Cross-Correlation Analysis", *Eur. J. Neurosci.* 2: 588-606.

Engel, A. K., Kreiter, A. K., Konig, P. et al. (1991) "Synchronization of oscillatory neuronal responses between striate and extrastriate visual cortical areas of the cat", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 6048-6052.

Fabri, M., Polonara, G., Mascioli, G. et al. (2011) "Topographical organization of human corpus callosum: an fMRI mapping study", *Brain Res.* 1370: 99-111.

Fagiolini, M., Pizzorusso, T., Berardi, N. et al. (1994) "Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation", *Vision Res* 34: 709-720.

Falchier, A., Clavagnier, S., Barone, P. et al. (2002) "Anatomical evidence of multimodal integration in primate striate cortex", *J. Neurosci.* 22: 5749-5759.

Felleman, D. J., Van Essen, D. C. (1991) "Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex", *Cereb. Cortex* 1: 1-47.

Feller, M. B. (2004) "Retinal waves drive calcium transients in undifferentiated retinal cells. Focus on "spontaneous waves in the ventricular zone of developing mammalian retina"", *J. Neurophysiol.* 91: 1940.

Feller, M. B., Butts, D. A., Aaron, H. L. et al. (1997) "Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves", *Neuron* 19: 293-306.

Feller, M. B., Wellis, D. P., Stellwagen, D. et al. (1996) "Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves", *Science* 272: 1182-1187.

Fieger, A., Roder, B., Teder-Salejarvi, W. et al. (2006) "Auditory spatial tuning in late-onset blindness in humans", *J. Cogn Neurosci.* 18: 149-157.

Foxe, J. J., Morocz, I. A., Murray, M. M. et al. (2000) "Multisensory auditory-somatosensory interactions in early cortical processing revealed by high-density electrical mapping", *Brain Res. Cogn Brain Res.* 10: 77-83.

Foxe, J. J., Wylie, G. R., Martinez, A. et al. (2002) "Auditory-somatosensory multisensory processing in auditory association cortex: an fMRI study", *J. Neurophysiol.* 88: 540-543.

Fries, P., Roelfsema, P. R., Engel, A. K. et al. (1997) "Synchronization of oscillatory responses in visual cortex correlates with perception in interocular rivalry", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 12699-12704.

Frost, D. O., Moy, Y. P. (1989) "Effects of dark rearing on the development of visual callosal connections", *Exp. Brain Res.* 78: 203-213.

Frost, D. O., Moy, Y. P., Smith, D. C. (1990) "Effects of alternating monocular occlusion on the development of visual callosal connections", *Exp. Brain Res.* 83: 200-209.

Fu, K. M., Johnston, T. A., Shah, A. S. et al. (2003) "Auditory cortical neurons respond to somatosensory stimulation", *J. Neurosci.* 23: 7510-7515.

Furukawa, T., Kozak, C. A., Cepko, C. L. (1997) "rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 3088-3093.

Games, K. D., Winer, J. A. (1988) "Layer V in rat auditory cortex: projections to the inferior colliculus and contralateral cortex", *Hear. Res.* 34: 1-25.

Gao, E., DeAngelis, G. C., Burkhalter, A. (2010) "Parallel input channels to mouse primary visual cortex", *J. Neurosci.* 30: 5912-5926.

Giard, M. H., Peronnet, F. (1999) "Auditory-visual integration during multimodal object recognition in humans: a behavioral and electrophysiological study", *J. Cogn Neurosci.* 11: 473-490.

Givre, S. J., Schroeder, C. E., Arezzo, J. C. (1994) "Contribution of extrastriate area V4 to the surface-recorded flash VEP in the awake macaque", *Vision Res* 34: 415-428.

Gougoux, F., Belin, P., Voss, P. et al. (2009) "Voice perception in blind persons: a functional magnetic resonance imaging study", *Neuropsychologia* 47: 2967-2974.

Gougoux, F., Lepore, F., Lassonde, M. et al. (2004) "Neuropsychology: pitch discrimination in the early blind", *Nature* 430: 309.

Gougoux, F., Zatorre, R. J., Lassonde, M. et al. (2005) "A functional neuroimaging study of sound localization: visual cortex activity predicts performance in early-blind individuals", *PLoS. Biol.* 3: e27.

Goyal, M. S., Hansen, P. J., Blakemore, C. B. (2006) "Tactile perception recruits functionally related visual areas in the late-blind", *Neuroreport* 17: 1381-1384.

Grant, K. W., Seitz, P. F. (1998) "Measures of auditory-visual integration in nonsense syllables and sentences", *J. Acoust. Soc. Am.* 104: 2438-2450.

Grant, K. W., Seitz, P. F. (2000) "The use of visible speech cues for improving auditory detection of spoken sentences", *J. Acoust. Soc. Am.* 108: 1197-1208.

Grant, K. W., Walden, B. E., Seitz, P. F. (1998) "Auditory-visual speech recognition by hearing-impaired subjects: consonant recognition, sentence recognition, and auditory-visual integration", *J. Acoust. Soc. Am.* 103: 2677-2690.

Gray, C. M., Singer, W. (1989) "Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 1698-1702.

Gregory, R. L. (1970) "The intelligent eye", McGraw-Hill, New York, USA.

Groh, A., Meyer, H. S., Schmidt, E. F. et al. (2010) "Cell-type specific properties of pyramidal neurons in neocortex underlying a layout that is modifiable depending on the cortical area", *Cereb. Cortex* 20: 826-836.

Grubb, M. S., Rossi, F. M., Changeux, J. P. et al. (2003) "Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor", *Neuron* 40: 1161-1172.

Guibal, C., Baker, G. E. (2009) "Abnormal axons in the albino optic tract", *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 5516-5521.

Hall, A. J., Lomber, S. G. (2008) "Auditory cortex projections target the peripheral field representation of primary visual cortex", *Exp. Brain Res.* 190: 413-430.

Hallman, L. E., Schofield, B. R., Lin, C. S. (1988) "Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat", *J Comp Neurol* 272: 149-160.

Hensch, T. K. (2005) "Critical period plasticity in local cortical circuits", *Nat. Rev. Neurosci* 6: 877-888.

Hertrich, I., Dietrich, S., Moos, A. et al. (2009) "Enhanced speech perception capabilities in a blind listener are associated with activation of fusiform gyrus and primary visual cortex", *Neurocase.* 15: 163-170.

Hirokawa, J., Bosch, M., Sakata, S. et al. (2008) "Functional role of the secondary visual cortex in multisensory facilitation in rats", *Neuroscience* 153: 1402-1417.

Hofbauer, A., Dräger, U. C. (1985) "Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus", *J. Comp Neurol.* 234: 465-474.

Hofer, S., Frahm, J. (2006) "Topography of the human corpus callosum revisited--comprehensive fiber tractography using diffusion tensor magnetic resonance imaging", *Neuroimage*. 32: 989-994.

Hofer, S., Merboldt, K. D., Tammer, R. et al. (2008) "Rhesus monkey and human share a similar topography of the corpus callosum as revealed by diffusion tensor MRI in vivo", *Cereb. Cortex* 18: 1079-1084.

Hooks, B. M., Chen, C. (2006) "Distinct roles for spontaneous and visual activity in remodeling of the retinogeniculate synapse", *Neuron* 52: 281-291.

Hubel, D. H., Wiesel, T. N. (1959) "Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex", *J Physiol* 148: 574-591.

Hubel, D. H., Wiesel, T. N. (1962) "Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex", *J Physiol* 160: 106-154.

Hubel, D. H., Wiesel, T. N. (1968) "Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex", *J Physiol* 195: 215-243.

Hubener, M., Bolz, J. (1988) "Morphology of identified projection neurons in layer 5 of rat visual cortex", *Neurosci. Lett.* 94: 76-81.

Hubener, M., Schwarz, C., Bolz, J. (1990) "Morphological types of projection neurons in layer 5 of cat visual cortex", *J Comp Neurol* 301: 655-674.

Huberman, A. D., Niell, C. M. (2011) "What can mice tell us about how vision works?", *Trends Neurosci.* 34: 464-473.

Huberman, A. D., Wang, G. Y., Liets, L. C. et al. (2003) "Eye-specific retinogeniculate segregation independent of normal neuronal activity", *Science* 300: 994-998.

Hupe, J. M., James, A. C., Payne, B. R. et al. (1998) "Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons", *Nature* 394: 784-787.

Ichida, J. M., Schwabe, L., Bressloff, P. C. et al. (2007) "Response facilitation from the "suppressive" receptive field surround of macaque V1 neurons", *J. Neurophysiol.* 98: 2168-2181.

Imas, O. A., Ropella, K. M., Ward, B. D. et al. (2005) "Volatile anesthetics disrupt frontal-posterior recurrent information transfer at gamma frequencies in rat", *Neurosci. Lett.* 387: 145-150.

Innocenti, G. M., Berbel, P., Clarke, S. (1988) "Development of projections from auditory to visual areas in the cat", *J. Comp Neurol.* 272: 242-259.

Innocenti, G. M., Frost, D. O. (1979) "Effects of visual experience on the maturation of the efferent system to the corpus callosum", *Nature* 280: 231-234.

Innocenti, G. M., Frost, D. O. (1980) "The postnatal development of visual callosal connections in the absence of visual experience or of the eyes", *Exp. Brain Res.* 39: 365-375.

Innocenti, G. M., Frost, D. O., Illes, J. (1985) "Maturation of visual callosal connections in visually deprived kittens: a challenging critical period", *J. Neurosci.* 5: 255-267.

Innocenti, G. M., Price, D. J. (2005) "Exuberance in the development of cortical networks", *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 955-965.

Isa, T., Sasaki, S. (2002) "Brainstem control of head movements during orienting; organization of the premotor circuits", *Prog. Neurobiol.* 66: 205-241.

Jacobs, B., Schall, M., Prather, M. et al. (2001) "Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study", *Cereb. Cortex* 11: 558-571.

Jacobs, G. H., Neitz, J., Deegan, J. F. (1991) "Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light", *Nature* 353: 655-656.

Jeffery, G. (1997) "The albino retina: an abnormality that provides insight into normal retinal development", *Trends Neurosci.* 20: 165-169.

Jeon, C. J., Strettoi, E., Masland, R. H. (1998) "The major cell populations of the mouse retina", *J. Neurosci.* 18: 8936-8946.

Johnson, R. R., Burkhalter, A. (1996) "Microcircuitry of forward and feedback connections within rat visual cortex", *J. Comp Neurol.* 368: 383-398.

Johnson, R. R., Burkhalter, A. (1997) "A polysynaptic feedback circuit in rat visual cortex", *J. Neurosci.* 17: 7129-7140.

Jolliffe, I. T. (2002) "Principal component analysis", 2e éd. Springer-Verlag, New York, NY, USA.

Kaas, J. H. (2011) "Neocortex in early mammals and its subsequent variations", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1225: 28-36.

Kaczmarek, L., Chaudhuri, A. (1997) "Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity", *Brain Res Brain Res Rev.* 23: 237-256.

Kahn, D. M., Krubitzer, L. (2002) "Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 11429-11434.

Karlen, S. J., Kahn, D. M., Krubitzer, L. (2006) "Early blindness results in abnormal corticocortical and thalamocortical connections", *Neuroscience* 142: 843-858.

Kasper, E. M., Larkman, A. U., Lubke, J. et al. (1994) "Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets", *J Comp Neurol* 339: 459-474.

Katz, L. C., Shatz, C. J. (1996) "Synaptic activity and the construction of cortical circuits", *Science* 274: 1133-1138.

Kauffman, T., Theoret, H., Pascual-Leone, A. (2002) "Braille character discrimination in blindfolded human subjects", *Neuroreport* 13: 571-574.

Kefalov, V. J. (2012) "Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches", *J. Biol. Chem.* 287: 1635-1641.

Kennedy, H., Bullier, J. (1985) "A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey", *J Neurosci* 5: 2815-2830.

King, A. J., Palmer, A. R. (1985) "Integration of visual and auditory information in bimodal neurones in the guinea-pig superior colliculus", *Exp. Brain Res.* 60: 492-500.

Kleinfeld, D., Ahissar, E., Diamond, M. E. (2006) "Active sensation: insights from the rodent vibrissa sensorimotor system", *Curr. Opin. Neurobiol.* 16: 435-444.

Klinge, C., Eippert, F., Roder, B. et al. (2010) "Corticocortical connections mediate primary visual cortex responses to auditory stimulation in the blind", *J. Neurosci.* 30: 12798-12805.

Konig, P., Engel, A. K., Singer, W. (1995) "Relation between oscillatory activity and long-range synchronization in cat visual cortex", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92: 290-294.

Krubitzer, L. (1995) "The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different?", *Trends Neurosci.* 18: 408-417.

Kujala, T., Alho, K., Huotilainen, M. et al. (1997) "Electrophysiological evidence for cross-modal plasticity in humans with early- and late-onset blindness", *Psychophysiology* 34: 213-216.

Kujala, T., Alho, K., Paavilainen, P. et al. (1992) "Neural plasticity in processing of sound location by the early blind: an event-related potential study", *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 84: 469-472.

Kujala, T., Huotilainen, M., Sinkkonen, J. et al. (1995) "Visual cortex activation in blind humans during sound discrimination", *Neurosci. Lett.* 183: 143-146.

Kujala, T., Palva, M. J., Salonen, O. et al. (2005) "The role of blind humans' visual cortex in auditory change detection", *Neurosci. Lett.* 379: 127-131.

Kupers, R., Beaulieu-Lefebvre, M., Schneider, F. C. et al. (2011) "Neural correlates of olfactory processing in congenital blindness", *Neuropsychologia* 49: 2037-2044.

Laczo, B., Antal, A., Niebergall, R. et al. (2011) "Transcranial alternating stimulation in a high gamma frequency range applied over V1 improves contrast perception but does not modulate spatial attention", *Brain Stimul.*

Laing, R. J., Bock, A. S., Lasiene, J. et al. (2012) "Role of retinal input on the development of striate-extrastriate patterns of connections in the rat", *J Comp Neurol.*

Lakatos, P., Chen, C. M., O'Connell, M. N. et al. (2007) "Neuronal oscillations and multisensory interaction in primary auditory cortex", *Neuron* 53: 279-292.

Lamme, V. A., Roelfsema, P. R. (2000) "The distinct modes of vision offered by feedforward and recurrent processing", *Trends Neurosci.* 23: 571-579.

Lamme, V. A., Spekreijse, H. (2000) "Modulations of primary visual cortex activity representing attentive and conscious scene perception", *Front Biosci.* 5: D232-D243.

Lamme, V. A., Super, H., Spekreijse, H. (1998) "Feedforward, horizontal, and feedback processing in the visual cortex", *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 529-535.

Lanciego, J. L., Wouterlood, F. G. (2011) "A half century of experimental neuroanatomical tracing", *J Chem. Neuroanat.* 42: 157-183.

Larsen, D. D., Callaway, E. M. (2006) "Development of layer-specific axonal arborizations in mouse primary somatosensory cortex", *J Comp Neurol.* 494: 398-414.

Larsen, D. D., Luu, J. D., Burns, M. E. et al. (2009) "What are the Effects of Severe Visual Impairment on the Cortical Organization and Connectivity of Primary Visual Cortex?", *Front Neuroanat.* 3: 30.

Larsen, D. D., Wickersham, I. R., Callaway, E. M. (2007) "Retrograde tracing with recombinant rabies virus reveals correlations between projection targets and dendritic architecture in layer 5 of mouse barrel cortex", *Front Neural Circuits.* 1: 5.

Larsen, W. J. (2003) "Embryologie Humaine", 2e éd. française. De Boeck, Bruxelles, Belgique, pp. 379-389.

Leclerc, C., Saint-Amour, D., Lavoie, M. E. et al. (2000) "Brain functional reorganization in early blind humans revealed by auditory event-related potentials", *Neuroreport* 11: 545-550.

Legendre, P., Legendre, L. (1998) "Numerical Ecology", 2nd. Elsevier, Amsterdam (The Netherlands).

Lequeux, L., Rio, M., Vigouroux, A. et al. (2008) "Confirmation of RAX gene involvement in human anophthalmia", *Clin. Genet.* 74: 392-395.

Lessard, N., Pare, M., Lepore, F. et al. (1998) "Early-blind human subjects localize sound sources better than sighted subjects", *Nature* 395: 278-280.

Lima, B., Singer, W., Neuenschwander, S. (2011) "Gamma responses correlate with temporal expectation in monkey primary visual cortex", *J. Neurosci.* 31: 15919-15931.

Ling, C., Schneider, G. E., Jhaveri, S. (1998) "Target-specific morphology of retinal axon arbors in the adult hamster", *Vis Neurosci* 15: 559-579.

Luo, H., Poeppel, D. (2012) "Cortical oscillations in auditory perception and speech: evidence for two temporal windows in human auditory cortex", *Front Psychol.* 3: 170.

Macaluso, E. (2006) "Multisensory processing in sensory-specific cortical areas", *Neuroscientist.* 12: 327-338.

MacLeod, A., Summerfield, Q. (1987) "Quantifying the contribution of vision to speech perception in noise", *Br. J. Audiol.* 21: 131-141.

- MacLeod, A., Summerfield, Q. (1990) "A procedure for measuring auditory and audio-visual speech-reception thresholds for sentences in noise: rationale, evaluation, and recommendations for use", *Br. J. Audiol.* 24: 29-43.
- Major, D. E., Rodman, H. R., Libedinsky, C. et al. (2003) "Pattern of retinal projections in the California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*): anterograde tracing study using cholera toxin", *J Comp Neurol.* 463: 317-340.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F. et al. (2002) "Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections", *Development* 129: 3945-3955.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y. et al. (2004) "Interneurons of the neocortical inhibitory system", *Nat. Rev. Neurosci* 5: 793-807.
- Marshall, J. H., Garrett, M. E., Nauhaus, I. et al. (2011) "Functional specialization of seven mouse visual cortical areas", *Neuron* 72: 1040-1054.
- Martell, A. L., Ramirez, J. M., Lasky, R. E. et al. (2012) "The role of voltage dependence of the NMDA receptor in cellular and network oscillation", *Eur. J. Neurosci.* 36: 2121-2136.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. et al. (1997) "The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development", *Nature* 387: 603-607.
- Matteau, I., Boire, D., Ptito, M. (2003) "Retinal projections in the cat: a cholera toxin B subunit study", *Vis Neurosci* 20: 481-493.
- Maunsell, J. H., Newsome, W. T. (1987) "Visual processing in monkey extrastriate cortex", *Annu. Rev. Neurosci* 10: 363-401.
- Merabet, L. B., Hamilton, R., Schlaug, G. et al. (2008) "Rapid and reversible recruitment of early visual cortex for touch", *PLoS. One.* 3: e3046.
- Meredith, M. A., Allman, B. L. (2009) "Subthreshold multisensory processing in cat auditory cortex", *Neuroreport* 20: 126-131.
- Meyer, K. (2011) "Primary sensory cortices, top-down projections and conscious experience", *Prog. Neurobiol.* 94: 408-417.
- Miller, E. K. (2000) "The prefrontal cortex and cognitive control", *Nat. Rev. Neurosci* 1: 59-65.

Molholm, S., Ritter, W., Murray, M. M. et al. (2002) "Multisensory auditory-visual interactions during early sensory processing in humans: a high-density electrical mapping study", *Brain Res. Cogn Brain Res.* 14: 115-128.

Moller, A. R. (2003) "Sensory Systems: Anatomy and Physiology", 1re éd. Academic Press, San Diego, U.S.A.

Molnár, Z., Cheung, A. F. (2006) "Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons", *Neurosci Res* 55: 105-115.

Molnár, Z., Garel, S., Lopez-Bendito, G. et al. (2012) "Mechanisms controlling the guidance of thalamocortical axons through the embryonic forebrain", *Eur J Neurosci* 35: 1573-1585.

Molotchnikoff, S., Sicard, E., Lachapelle, P. (1987) "Modulations of collicular visual responses by acoustic stimuli in rabbits", *Neurosci. Res.* 4: 385-395.

Murray, M. M., Foxe, J. J., Higgins, B. A. et al. (2001) "Visuo-spatial neural response interactions in early cortical processing during a simple reaction time task: a high-density electrical mapping study", *Neuropsychologia* 39: 828-844.

Murray, M. M., Molholm, S., Michel, C. M. et al. (2005) "Grabbing your ear: rapid auditory-somatosensory multisensory interactions in low-level sensory cortices are not constrained by stimulus alignment", *Cereb. Cortex* 15: 963-974.

Muzio, L., Mallamaci, A. (2003) "Emx1, emx2 and pax6 in specification, regionalization and arealization of the cerebral cortex", *Cereb. Cortex* 13: 641-647.

Nase, G., Singer, W., Monyer, H. et al. (2003) "Features of neuronal synchrony in mouse visual cortex", *J. Neurophysiol.* 90: 1115-1123.

Nassi, J. J., Callaway, E. M. (2009) "Parallel processing strategies of the primate visual system", *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 360-372.

Niell, C. M., Stryker, M. P. (2008) "Highly selective receptive fields in mouse visual cortex", *J. Neurosci.* 28: 7520-7536.

Niemeyer, W., Starlinger, I. (1981) "Do the blind hear better? Investigations on auditory processing in congenital or early acquired blindness. II. Central functions", *Audiology* 20: 510-515.

Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Juijzen, C. (2008) "The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas", 4e éd. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

O'Brien, B. J., Olavarria, J. F. (1995) "Anomalous patterns of callosal connections develop in visual cortex of monocularly enucleated hamsters", *Biol. Res.* 28: 211-218.

O'Leary, D. D., Chou, S. J., Sahara, S. (2007) "Area patterning of the mammalian cortex", *Neuron* 56: 252-269.

O'Leary, D. D., Nakagawa, Y. (2002) "Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex", *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 14-25.

Ogawa, T., Riera, J., Goto, T. et al. (2011) "Large-scale heterogeneous representation of sound attributes in rat primary auditory cortex: from unit activity to population dynamics", *J. Neurosci.* 31: 14639-14653.

Olavarria, J., Bravo, H., Ruiz, G. (1988) "The pattern of callosal connections in posterior neocortex of congenitally anophthalmic rats", *Anat. Embryol. (Berl)* 178: 155-159.

Olavarria, J., Li, C. P. (1995) "Effects of neonatal enucleation on the organization of callosal linkages in striate cortex of the rat", *J. Comp Neurol.* 361: 138-151.

Olavarria, J., Malach, R., Van Sluyters, R. C. (1987) "Development of visual callosal connections in neonatally enucleated rats", *J. Comp Neurol.* 260: 321-348.

Olavarria, J., Montero, V. M. (1984) "Relation of callosal and striate-extrastriate cortical connections in the rat: morphological definition of extrastriate visual areas", *Exp. Brain Res.* 54: 240-252.

Olavarria, J., Montero, V. M. (1989) "Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections", *Vis. Neurosci.* 3: 59-69.

Olavarria, J., Van Sluyters, R. C. (1984) "Callosal connections of the posterior neocortex in normal-eyed, congenitally anophthalmic, and neonatally enucleated mice", *J. Comp Neurol.* 230: 249-268.

Olavarria, J., Van Sluyters, R. C. (1985) "Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat", *J. Comp Neurol.* 239: 1-26.

Olavarria, J. F., Hiroi, R. (2003) "Retinal influences specify cortico-cortical maps by postnatal day six in rats and mice", *J. Comp Neurol.* 459: 156-172.

Olavarria, J. F., Safaeian, P. (2006) "Development of callosal topography in visual cortex of normal and enucleated rats", *J. Comp Neurol.* 496: 495-512.

Orban, G. A. (2008) "Higher order visual processing in macaque extrastriate cortex", *Physiol Rev.* 88: 59-89.

Pallas, S. L. (2001) "Intrinsic and extrinsic factors that shape neocortical specification", *Trends Neurosci* 24: 417-423.

Panagiotaropoulos, T. I., Deco, G., Kapoor, V. et al. (2012) "Neuronal discharges and gamma oscillations explicitly reflect visual consciousness in the lateral prefrontal cortex", *Neuron* 74: 924-935.

Paperna, T., Malach, R. (1991) "Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat", *J. Comp Neurol.* 308: 432-456.

Park, H. J., Kim, J. J., Lee, S. K. et al. (2008) "Corpus callosal connection mapping using cortical gray matter parcellation and DT-MRI", *Hum. Brain Mapp.* 29: 503-516.

Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F. et al. (2005) "The plastic human brain cortex", *Annu. Rev. Neurosci* 28: 377-401.

Pascual-Leone, A., Hamilton, R. (2001) "The metamodal organization of the brain", *Prog. Brain Res* 134: 427-445.

Pascual-Leone, A., Walsh, V. (2001) "Fast backprojections from the motion to the primary visual area necessary for visual awareness", *Science* 292: 510-512.

Paxinos, G. E., Franklin, K. B. J. (2001) "The mouse brain in stereotaxic coordinates", 2e éd. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Payne, B. R., Siwek, D. F. (1991) "The visual map in the corpus callosum of the cat", *Cereb. Cortex* 1: 173-188.

Perry, V. H., Cowey, A. (1984) "Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey", *Neuroscience* 12: 1125-1137.

Perry, V. H., Oehler, R., Cowey, A. (1984) "Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey", *Neuroscience* 12: 1101-1123.

Piche, M., Robert, S., Miceli, D. et al. (2004) "Environmental enrichment enhances auditory takeover of the occipital cortex in anophthalmic mice", *Eur. J. Neurosci.* 20: 3463-3472.

Price, D. J., Kennedy, H., Dehay, C. et al. (2006) "The development of cortical connections", *Eur. J. Neurosci.* 23: 910-920.

- Rach, S., Diederich, A., Colonius, H. (2011) "On quantifying multisensory interaction effects in reaction time and detection rate", *Psychol. Res.* 75: 77-94.
- Rash, B. G., Grove, E. A. (2006) "Area and layer patterning in the developing cerebral cortex", *Curr. Opin. Neurobiol.* 16: 25-34.
- Rees, G., Kreiman, G., Koch, C. (2002) "Neural correlates of consciousness in humans", *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 261-270.
- Regal, D. M., Boothe, R., Teller, D. Y. et al. (1976) "Visual acuity and visual responsiveness in dark-reared monkeys (*Macaca nemestrina*)", *Vision Res* 16: 523-530.
- Rhoades, R. W., Dellacroce, D. D. (1980) "Neonatal enucleation induces an asymmetric pattern of visual callosal connections in hamsters", *Brain Res.* 202: 189-195.
- Rhoades, R. W., Fish, S. E., Mooney, R. D. et al. (1987) "Distribution of visual callosal projection neurons in hamsters subjected to transection of the optic radiations on the day of birth", *Brain Res.* 429: 217-232.
- Rhoades, R. W., Mooney, R. D., Fish, S. E. (1984) "A comparison of visual callosal organization in normal, bilaterally enucleated and congenitally anophthalmic mice", *Exp. Brain Res.* 56: 92-105.
- Rhodes, P. (2006) "The properties and implications of NMDA spikes in neocortical pyramidal cells", *J. Neurosci.* 26: 6704-6715.
- Rizzolatti, G., Matelli, M. (2003) "Two different streams form the dorsal visual system: anatomy and functions", *Exp. Brain Res.* 153: 146-157.
- Ro, T., Breitmeyer, B., Burton, P. et al. (2003) "Feedback contributions to visual awareness in human occipital cortex", *Curr. Biol* 13: 1038-1041.
- Rockland, K. S., Ojima, H. (2003) "Multisensory convergence in calcarine visual areas in macaque monkey", *Int. J. Psychophysiol.* 50: 19-26.
- Rockland, K. S., Pandya, D. N. (1979) "Laminar origins and terminations of cortical connections of the occipital lobe in the rhesus monkey", *Brain Res.* 179: 3-20.
- Rockland, K. S., Pandya, D. N. (1986) "Topography of occipital lobe commissural connections in the rhesus monkey", *Brain Res.* 365: 174-178.

Roder, B., Rosler, F., Hennighausen, E. et al. (1996) "Event-related potentials during auditory and somatosensory discrimination in sighted and blind human subjects", *Brain Res. Cogn Brain Res.* 4: 77-93.

Roder, B., Rosler, F., Neville, H. J. (2000) "Event-related potentials during auditory language processing in congenitally blind and sighted people", *Neuropsychologia* 38: 1482-1502.

Roder, B., Teder-Salejarvi, W., Sterr, A. et al. (1999) "Improved auditory spatial tuning in blind humans", *Nature* 400: 162-166.

Roelfsema, P. R., Engel, A. K., Konig, P. et al. (1997) "Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas", *Nature* 385: 157-161.

Romand, S., Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M. et al. (2011) "Morphological development of thick-tufted layer v pyramidal cells in the rat somatosensory cortex", *Front Neuroanat.* 5: 5.

Rosenbluth, R., Grossman, E. S., Kaitz, M. (2000) "Performance of early-blind and sighted children on olfactory tasks", *Perception* 29: 101-110.

Rubenstein, J. L. (2011) "Annual Research Review: Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders", *J. Child Psychol. Psychiatry* 52: 339-355.

Sadato, N., Hallett, M. (1999) "fMRI occipital activation by tactile stimulation in a blind man", *Neurology* 52: 423.

Sadato, N., Okada, T., Kubota, K. et al. (2004) "Tactile discrimination activates the visual cortex of the recently blind naive to Braille: a functional magnetic resonance imaging study in humans", *Neurosci. Lett.* 359: 49-52.

Sadato, N., Pascual-Leone, A., Grafman, J. et al. (1998) "Neural networks for Braille reading by the blind", *Brain* 121 (Pt 7): 1213-1229.

Sadato, N., Pascual-Leone, A., Grafman, J. et al. (1996) "Activation of the primary visual cortex by Braille reading in blind subjects", *Nature* 380: 526-528.

Salvolini, U., Polonara, G., Mascioli, G. et al. (2010) "[Functional topography of the human corpus callosum]", *Bull. Acad. Natl. Med.* 194: 617-631.

Sanes, D. H., Reh, T. A., Harris, W. A. (2012) "Development of the nervous system", 3e éd. Elsevier, Oxford, UK.

Schiller, J., Major, G., Koester, H. J. et al. (2000) "NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons", *Nature* 404: 285-289.

Schneider, G. E. (1967) "Contrasting visuomotor functions of tectum and cortex in the golden hamster", *Psychol. Forsch.* 31: 52-62.

Schofield, B. R., Hallman, L. E., Lin, C. S. (1987) "Morphology of corticotectal cells in the primary visual cortex of hooded rats", *J Comp Neurol* 261: 85-97.

Schroeder, C. E., Foxe, J. J. (2002) "The timing and laminar profile of converging inputs to multisensory areas of the macaque neocortex", *Brain Res. Cogn Brain Res.* 14: 187-198.

Schroeder, C. E., Mehta, A. D., Givre, S. J. (1998) "A spatiotemporal profile of visual system activation revealed by current source density analysis in the awake macaque", *Cereb Cortex* 8: 575-592.

Schuett, S., Bonhoeffer, T., Hubener, M. (2002) "Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging", *J. Neurosci.* 22: 6549-6559.

Schwabe, L., Obermayer, K., Angelucci, A. et al. (2006) "The role of feedback in shaping the extra-classical receptive field of cortical neurons: a recurrent network model", *J. Neurosci.* 26: 9117-9129.

Schwartz, J. L., Berthommier, F., Savariaux, C. (2004) "Seeing to hear better: evidence for early audio-visual interactions in speech identification", *Cognition* 93: B69-B78.

Shatz, C. J., Stryker, M. P. (1988) "Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents", *Science* 242: 87-89.

Shimamura, K., Rubenstein, J. L. (1997) "Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain", *Development* 124: 2709-2718.

Shimogori, T., Banuchi, V., Ng, H. Y. et al. (2004) "Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex", *Development* 131: 5639-5647.

Shore, S. E., Vass, Z., Wys, N. L. et al. (2000) "Trigeminal ganglion innervates the auditory brainstem", *J. Comp Neurol.* 419: 271-285.

Silver, J., Puck, S. M., Albert, D. M. (1984) "Development and aging of the eye in mice with inherited optic nerve aplasia: histopathological studies", *Exp. Eye Res.* 38: 257-266.

Soloway, A. S., Pucak, M. L., Melchitzky, D. S. et al. (2002) "Dendritic morphology of callosal and ipsilateral projection neurons in monkey prefrontal cortex", *Neuroscience* 109: 461-471.

Sommers, M. S., Tye-Murray, N., Spehar, B. (2005) "Auditory-visual speech perception and auditory-visual enhancement in normal-hearing younger and older adults", *Ear Hear.* 26: 263-275.

Sporns, O. (2011a) "Networks of the brain", The MIT Press, Cambridge, MA.

Sporns, O. (2011b) "The human connectome: a complex network", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1224: 109-125.

Spruston, N. (2008) "Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration", *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 206-221.

Starlinger, I., Niemeyer, W. (1981) "Do the blind hear better? Investigations on auditory processing in congenital or early acquired blindness. I. Peripheral functions", *Audiology* 20: 503-509.

Stein, B. E., Meredith, M. A. (1993) "The merging of the senses", The MIT Press, Cambridge, MA, USA.

Stein, B. E., Stanford, T. R. (2008) "Multisensory integration: current issues from the perspective of the single neuron", *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 255-266.

Sterzer, P., Haynes, J. D., Rees, G. (2006) "Primary visual cortex activation on the path of apparent motion is mediated by feedback from hMT+/V5", *Neuroimage.* 32: 1308-1316.

Stevens, A. A., Weaver, K. (2005) "Auditory perceptual consolidation in early-onset blindness", *Neuropsychologia* 43: 1901-1910.

Storm, E. E., Garel, S., Borello, U. et al. (2006) "Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers", *Development* 133: 1831-1844.

Stryker, M. P., Harris, W. A. (1986) "Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex", *J. Neurosci.* 6: 2117-2133.

Super, H., Spekreijse, H., Lamme, V. A. (2001) "Two distinct modes of sensory processing observed in monkey primary visual cortex (V1)", *Nat. Neurosci* 4: 304-310.

Syed, M. M., Lee, S., Zheng, J. et al. (2004) "Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina", *J. Physiol* 560: 533-549.

Szél, Á., Röhlich, P., Caffé, A. R. et al. (1992) "Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina", *J. Comp Neurol.* 325: 327-342.

Tabachnick, B. G., Fidell, L. S. (2007) "Using multivariate statistics", 5e éd. Pearson Education, Boston, MA, USA.

Thomas, H. C., Espinoza, S. G. (1987) "Relationships between interhemispheric cortical connections and visual areas in hooded rats", *Brain Res.* 417: 214-224.

Tomioka, R., Rockland, K. S. (2006) "Improved Golgi-like visualization in retrogradely projecting neurons after EGFP-adenovirus infection in adult rat and monkey", *J. Histochem. Cytochem.* 54: 539-548.

Tong, F. (2003) "Primary visual cortex and visual awareness", *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 219-229.

Tsiola, A., Hamzei-Sichani, F., Peterlin, Z. et al. (2003) "Quantitative morphologic classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex", *J Comp Neurol.* 461: 415-428.

Tucker, P., Laemle, L., Munson, A. et al. (2001) "The eyeless mouse mutation (ey1) removes an alternative start codon from the Rx/rax homeobox gene", *Genesis.* 31: 43-53.

Ungerleider, L. G., Courtney, S. M., Haxby, J. V. (1998) "A neural system for human visual working memory", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 883-890.

Ungerleider, L. G., Haxby, J. V. (1994) "'What' and 'where' in the human brain", *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 157-165.

Van Boven, R. W., Hamilton, R. H., Kauffman, T. et al. (2000) "Tactile spatial resolution in blind braille readers", *Neurology* 54: 2230-2236.

Van der Gucht, E., Hof, P. R., Van, B. L. et al. (2007) "Neurofilament protein and neuronal activity markers define regional architectonic parcellation in the mouse visual cortex", *Cereb. Cortex* 17: 2805-2819.

Van Essen, D. C., Gallant, J. L. (1994) "Neural mechanisms of form and motion processing in the primate visual system", *Neuron* 13: 1-10.

Van Essen, D. C., Newsome, W. T., Bixby, J. L. (1982) "The pattern of interhemispheric connections and its relationship to extrastriate visual areas in the macaque monkey", *J. Neurosci.* 2: 265-283.

Verma, A. S., Fitzpatrick, D. R. (2007) "Anophthalmia and microphthalmia", *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2: 47.

Voelker, C. C., Garin, N., Taylor, J. S. et al. (2004) "Selective neurofilament (SMI-32, FNP-7 and N200) expression in subpopulations of layer V pyramidal neurons in vivo and in vitro", *Cereb Cortex* 14: 1276-1286.

Voss, P., Gougoux, F., Lassonde, M. et al. (2006) "A positron emission tomography study during auditory localization by late-onset blind individuals", *Neuroreport* 17: 383-388.

Voss, P., Gougoux, F., Zatorre, R. J. et al. (2008) "Differential occipital responses in early- and late-blind individuals during a sound-source discrimination task", *Neuroimage.* 40: 746-758.

Voss, P., Lassonde, M., Gougoux, F. et al. (2004) "Early- and late-onset blind individuals show supra-normal auditory abilities in far-space", *Curr. Biol.* 14: 1734-1738.

Wagor, E., Mangini, N. J., Pearlman, A. L. (1980) "Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse", *J. Comp Neurol.* 193: 187-202.

Wallace, M. T., Ramachandran, R., Stein, B. E. (2004) "A revised view of sensory cortical parcellation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 2167-2172.

Wan, C. Y., Wood, A. G., Reutens, D. C. et al. (2010) "Congenital blindness leads to enhanced vibrotactile perception", *Neuropsychologia* 48: 631-635.

Wanet-Defalque, M. C., Veraart, C., De Volder, A. G. et al. (1988) "High metabolic activity in the visual cortex of early blind human subjects", *Brain Res.* 446: 369-373.

Wang, Q., Burkhalter, A. (2007) "Area map of mouse visual cortex", *J. Comp Neurol.* 502: 339-357.

Wang, Q., Gao, E., Burkhalter, A. (2007) "In vivo transcranial imaging of connections in mouse visual cortex", *J. Neurosci. Methods* 159: 268-276.

Wang, Q., Gao, E., Burkhalter, A. (2011) "Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex", *J. Neurosci.* 31: 1905-1918.

Wang, Q., Sporns, O., Burkhalter, A. (2012) "Network analysis of corticocortical connections reveals ventral and dorsal processing streams in mouse visual cortex", *J. Neurosci.* 32: 4386-4399.

Ward, J. H. (1963) "Hierarchical grouping to optimize an objective function", *J. Am. Stat. Assoc.* 58: 236-244.

Warland, D. K., Huberman, A. D., Chalupa, L. M. (2006) "Dynamics of spontaneous activity in the fetal macaque retina during development of retinogeniculate pathways", *J. Neurosci.* 26: 5190-5197.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E. et al. (2002) "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome", *Nature* 420: 520-562.

Watkins-Chow, D. E., Pavan, W. J. (2008) "Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain", *Genome Res.* 18: 60-66.

Weaver, K. E., Stevens, A. A. (2007) "Attention and sensory interactions within the occipital cortex in the early blind: an fMRI study", *J. Cogn Neurosci.* 19: 315-330.

Weeks, R., Horwitz, B., Aziz-Sultan, A. et al. (2000) "A positron emission tomographic study of auditory localization in the congenitally blind", *J. Neurosci.* 20: 2664-2672.

Williams, S. R., Stuart, G. J. (2002) "Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons", *Science* 295: 1907-1910.

Williams, S. R., Stuart, G. J. (2003) "Role of dendritic synapse location in the control of action potential output", *Trends Neurosci* 26: 147-154.

Wittenberg, G. F., Werhahn, K. J., Wassermann, E. M. et al. (2004) "Functional connectivity between somatosensory and visual cortex in early blind humans", *Eur. J. Neurosci.* 20: 1923-1927.

Xu, H. P., Furman, M., Mineur, Y. S. et al. (2011) "An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development", *Neuron* 70: 1115-1127.

Yeterian, E. H., Pandya, D. N., Tomaiuolo, F. et al. (2012) "The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain", *Cortex* 48: 58-81.

Zeki, S. M. (1977) "Simultaneous anatomical demonstration of the representation of the vertical and horizontal meridians in areas V2 and V3 of rhesus monkey visual cortex", *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 195: 517-523.

Zeki, S. M. (1978) "The cortical projections of foveal striate cortex in the rhesus monkey", *J. Physiol* 277: 227-244.

Zeki, S. M., Sandeman, D. R. (1976) "Combined anatomical and electrophysiological studies on the boundary between the second and third visual areas of rhesus monkey cortex", *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 194: 555-562.

Zhang, Z. G., Hu, L., Hung, Y. S. et al. (2012) "Gamma-band oscillations in the primary somatosensory cortex--a direct and obligatory correlate of subjective pain intensity", *J. Neurosci.* 32: 7429-7438.

Zhou, J., Shore, S. (2004) "Projections from the trigeminal nuclear complex to the cochlear nuclei: a retrograde and anterograde tracing study in the guinea pig", *J. Neurosci. Res.* 78: 901-907.

Zhou, J., Shore, S. (2006) "Convergence of spinal trigeminal and cochlear nucleus projections in the inferior colliculus of the guinea pig", *J. Comp Neurol.* 495: 100-112.

Zhou, Z. J., Zhao, D. (2000) "Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves", *J. Neurosci.* 20: 6570-6577.